

MIKROCHEMIE

Internationales Archiv für deren Gesamtgebiet

Redigiert von

W. BÖTTGER, Leipzig / F. EMICH, Graz / H. EPPINGER, Wien / F. FEIGL, Wien
H. LIEB, Graz / H. MOLISCH, Wien / F. PREGL †, Graz / R. WASICKY, Wien.

Unter Mitwirkung von:

E. Abderhalden - Halle, H. Alber - New York, H. V. Arny - New York, Y. Asahina - Tokio, G. Barger - Edinburgh, A. Benedetti-Pichler - New York, R. Berg - Königsberg, G. Bertrand - Paris, W. Biltz - Hannover, J. C. Bock-Milwaukee, E. M. Chamot-Ithaca, O. Dafert - Wien, G. Denigès-Bordeaux, J. Donau-Graz, J. Dubský - Brünn, R. Eder - Zürich, S. Edlbacher - Basel, R. Ehrenberg - Göttingen, H. v. Euler-Stockholm, F. K. Faber - Wien, B. Flaschenträger - Zürich, E. Freund - Wien, A. Friedrich - Wien, F. Fuhrmann - Graz, O. Fürth - Wien, W. Geilmann - Hannover, W. C. de Graaf - Utrecht, H. Gräveson - Delft, H. G. Greenish - London, R. Grengg - Wien, F. L. Hahn - Paris, M. Haltinger - Wien, F. Haurowitz - Prag, K. Heller - Prag, J. Heyrovsky - Prag, L. van Itallie - Leiden, H. Jansch - Wien, S. Kakiuchi - Tokio, J. Kendall - Edinburgh, J. Kisser - Wien, G. Klein-Heidelberg, H. Kleinmann - Berlin, P. D. C. Kley - Delft, F. Knoop - Tübingen, L. Kofler - Innsbruck, J. M. Kolthoff - Minneapolis, G. Lunde-Stavanger, K. L. Maljaroff - Moskau, A. Martini - Rosario, J. W. Matthews - London, A. Mayrhofer - Wien, L. B. Mendel - New Haven, A. Mioiati - Padova, J. B. Niederl - New York, W. Nonnenbruch - Prag, F. Paneth - London, J. K. Parnas - Lemberg, V. Patzelt - Wien, W. Paull - Wien, E. Philippi - Innsbruck, L. Pincussen - Berlin, D. Priantchnikow - Moskau, H. Pribram - Prag, F. Rappaport - Wien, K. Rast - Leverkusen, P. Rona - Berlin, L. Rosenthaler - Bern, O. Ruff - Breslau, H. Schmalfuß - Hamburg, E. Schmitz - Breslau, N. Schoorl - Utrecht, F. Schulz - Jena, C. Schwarz - Wien, Y. Shibata - Tokio, H. Siedentopf - Jena, E. v. Skramlik - Jena, D. van Slyke - New York, A. Soltys - Graz, E. Stärkenstein - Prag, Z. Stary - Prag, W. Stepp - Breslau, A. Stock - Karlsruhe, J. Stoklasa - Prag, K. Thomas - Leipzig, J. Tillmans - Frankfurt a. M., A. Tschermak-Seysenegg - Prag, A. Tschirch - Bern, C. Urbach - Prag, A. Viehoever - Philadelphia, C. Weygand - Leipzig, H. Winterstein - Breslau, O. Wintersteiner - New York, F. Zaribnicky - Wien, R. Zeynek - Prag.

Inhaltsverzeichnis

Originalabhandlungen:	pag.		pag.
F. Rappaport und H. Engelberg: Beiträge zur Jodometrie. II. Mitteilung: Mikrojodbestimmung durch ein Potenzierungsverfahren (mit 3 Textfiguren und 2 Tabellen)	1	F. Feigl, V. Anger und R. Zappert: Über die Verwendung von Tüpfelreaktionen zum Nachweis von organischen Verbindungen. VI. Nachweis von aliphatischen und aromatischen Aminen mit Fluoresceinchlorid (mit 6 Tabellen)	67
P. L. Kirk: Quantitative Drop Analysis. III. The Kjeldahl Nitrogen Determination and Non-Protein Nitrogen of Blood (m. 4 Textfiguren und 3 Tabellen)	13	F. Feigl u. O. Frehden: Über die Verwendung von Tüpfelreaktionen zum Nachweis von organischen Verbindungen. VII. Nachweis reaktionsfähiger CH_2 - und NH_2 -Gruppen (mit 2 Tabellen)	79
G. E. Gibbs und P. L. Kirk: Quantitative Drop Analysis. IV. The Determination of Urea and Ammonia (mit 1 Textfigur und 5 Tabellen)	25		
L. Rosenthaler: Kristallfällung durch Aussalzung (mit 1 Tabelle)	37	Sammelreferat:	
K. Silink: Contributions to the Biochemistry and Physiology of Cholesterol. A. Technique of the Mikroanalysis of Cholesterol. I. Communication (mit 9 Textfiguren und 11 Tabellen)	45	A. Wasitzky: Kohlehydrate. II. Teil.	87
		Bücherschau	115
		Varia	117

Mit 17 Abbildungen im Text und 30 Tabellen.

Mikrochemie erscheint in zwangloser Folge — in Lieferungen von verschiedenem Umfang.

EMIL HAIM & CO.

WIEN UND LEIPZIG

1934

Wir empfehlen beiliegende Prospekte besonderer Beachtung

PAUL HAACK

Wien, IX./3, Garelligasse Nr. 4

Gegründet 1893

Telephon Nr. A-22-0-25

Postspark.-Konto 48.473

**Alle Apparate für die
quantitative organische Mikroanalyse**

nach Prof. Pregl

**Alle mikrochemischen
Apparate und Behelfe**

nach Prof. Emich

Behelfe zur Tüpfelanalyse

nach Doz. Feigl

**Spezial-Reagenzien für analytische Chemie
Chemische und bakteriologische Apparate**

**Eigene Werkstätte für Glasbläserei, Ätzerei,
Schleiferei und Laboratoriums - Utensilien**

Unsere Vertretung in U. S. A.:

MICROCHEMICAL SERVICE

30 Van Zandt Ave., Douglaston, New York

MIKROCHEMIE

Internationales Archiv für deren Gesamtgebiet

Redigiert von

W. BÖTTGER, Leipzig / F. EMICH, Graz / H. EPPINGER, Wien / F. FEIGL, Wien

H. LIEB, Graz / H. MOLISCH, Wien / F. PREGL †, Graz / R. WASICKY, Wien.

Unter Mitwirkung von:

E. Abderhalden - Halle, H. Alber - New York, H. V. Army - New York, Y. Asahina - Tokio, G. Barger - Edinburgh, A. Benedetti-Pichler - New York, R. Berg - Königsberg, G. Bertrand - Paris, W. Biltz - Hannover, J. C. Bock - Milwaukee, E. M. Chamot - Ithaca, O. Dafert - Wien, G. Denigès - Bordeaux, J. Donau - Graz, J. Dubský - Brünn, R. Eder - Zürich, S. Edlbacher - Basel, R. Ehrenberg - Göttingen, H. v. Euler - Stockholm, F. K. Faber - Wien, B. Flaschenträger - Zürich, E. Freund - Wien, A. Friedrich - Wien, F. Fuhrmann - Graz, O. Fürth - Wien, W. Geilmann - Hannover, W. C. de Graaf - Utrecht, H. Gravestien - Delft, H. G. Greenish - London, R. Grengg - Wien, F. L. Hahn - Paris, M. Haitinger - Wien, F. Haurowitz - Prag, K. Heller - Prag, J. Heyrovský - Prag, L. van Itallie - Leiden, H. Jansch - Wien, S. Kakiuchi - Tokio, J. Kendall - Edinburgh, J. Kisser - Wien, G. Klein - Heidelberg, H. Kleinmann - Berlin, P. D. C. Kley - Delft, F. Knoop - Tübingen, L. Kofler - Innsbruck, J. M. Kolthoff - Minneapolis, G. Lunde - Stavanger, K. L. Maljaroff - Moskau, A. Martini - Rosario, J. W. Matthews - London, A. Mavrhofer - Wien, L. B. Mendel - New Haven, A. Miolati - Padova, J. B. Niederl - New York, W. Nonnenbruch - Prag, F. Paneth - London, J. K. Parnas - Lemberg, V. Patzelt - Wien, W. Pauli - Wien, E. Philippi - Innsbruck, L. Pincussen - Berlin, D. Prianschnikow - Moskau, H. Pribram - Prag, F. Rappaport - Wien, K. Rast - Leverkusen, P. Rona - Berlin, L. Rosenthaler - Bern, O. Ruff - Breslau, H. Schmalzfuß - Hamburg, E. Schmitz - Breslau, N. Schoorl - Utrecht, F. Schulz - Jena, C. Schwarz - Wien, Y. Shibata - Tokio, H. Siedentopf - Jena, E. v. Skramlik - Jena, D. D. van Slyke - New York, A. Soltys - Graz, E. Starkenstein - Prag, Z. Stary - Prag, W. Stepp - Breslau, A. Stock - Karlsruhe, J. Stoklasa - Prag, K. Thomas - Leipzig, J. Tillmans - Frankfurt a. M., A. Tschermak-Seysenegg - Prag, A. Tschirch - Bern, C. Urbach - Prag, A. Viehoveer - Philadelphia, C. Weygand - Leipzig, H. Winterstein - Breslau, O. Wintersteiner - New York, F. Zaribnicky - Wien, R. Zeynek - Prag.

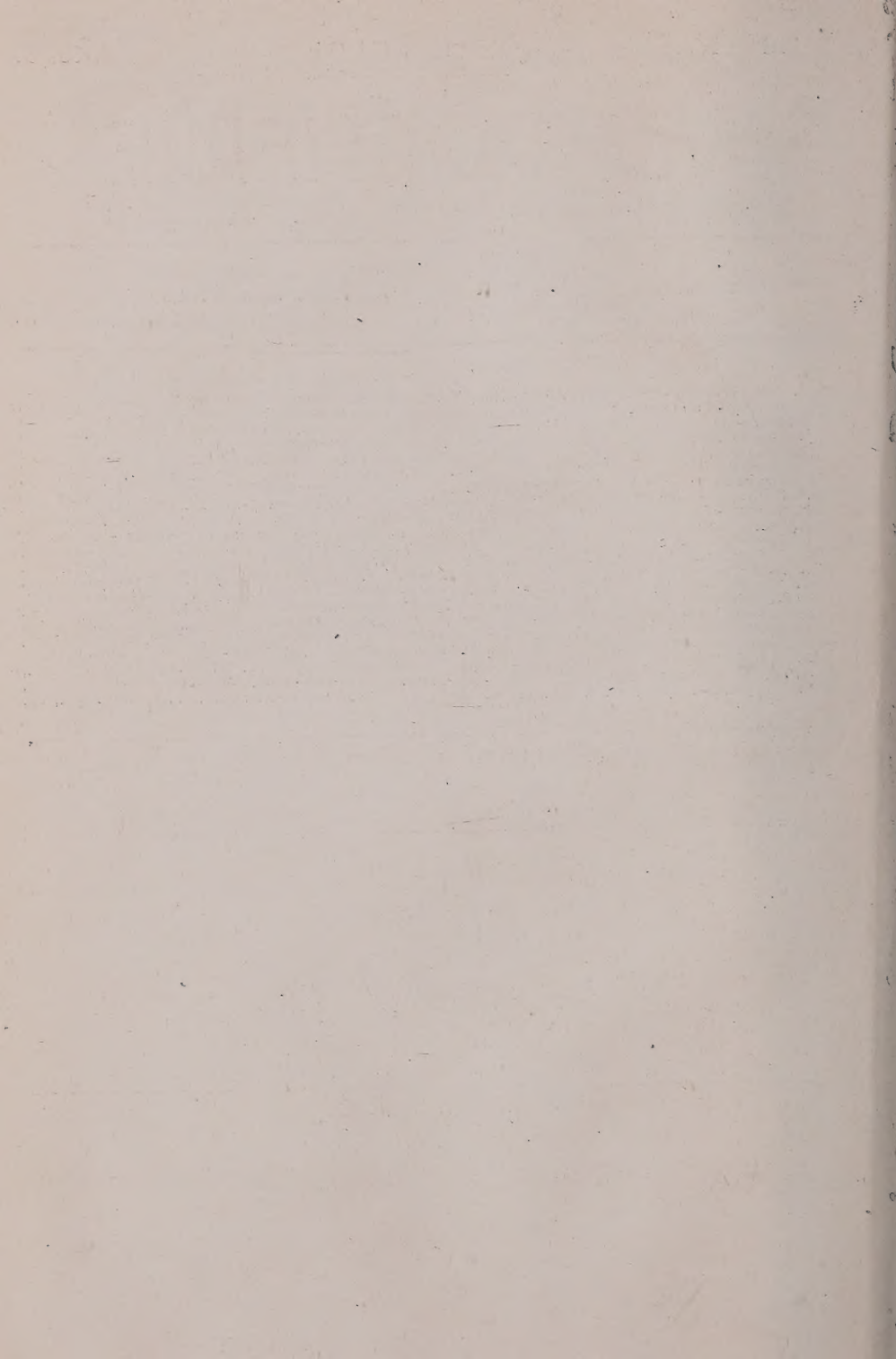
Mit 30 Abbildungen im Text, 5 Tafeln
und 51 Tabellen



EMIL HAIM & CO.

WIEN UND LEIPZIG

1935



INHALTSVERZEICHNIS.

A. ORIGINALABHANDLUNGEN.

	Seite
ANGER, V., siehe FEIGL, F., V. ANGER und R. ZAPPERT.	
BERISSO, B., siehe MARTINI, A., und B. BERISSO.	
BEUTLER, R., Die Bestimmung des Rohrzuckergehaltes kleinster Flüssigkeitsmengen durch Messung von spez. Gewicht und spez. Drehung . . .	133
BRICKENKAMP, R. W., siehe CHAMOT, E. M., and R. W. BRICKENKAMP.	
CHAMOT, E. M., and R. W. BRICKENKAMP, Microscopic Chemical Reactions of some of the Polythionic Acids	121
ENGELBERG, H., siehe RAPPAPORT, F., und H. ENGELBERG.	
FEIGL, F., V. ANGER und R. ZAPPERT, Über die Verwendung von Tüpfelreaktionen zum Nachweis von organischen Verbindungen. VI. Nachweis von aliphatischen und aromatischen Aminen mit Fluoresceinchlorid . . .	67
FEIGL, F., und O. FREHDEN, Über die Verwendung von Tüpfelreaktionen zum Nachweis von organischen Verbindungen. VII. Nachweis reaktionsfähiger CH ₂ - und NH ₂ -Gruppen	79
FREHDEN, O., siehe FEIGL, F. und O. FREHDEN.	
GIBBS, G. E., and P. L. KIRK, Quantitative Drop Analysis. IV. The Determination of Urea and Ammonia	25
HARTNER, F., Über die Bestimmung kleinster Rhodanmengen in biologischen Flüssigkeiten	141
HOEHNE, K., siehe MEYER, J., und K. HOEHNE.	
KIRK, P. L., Quantitative Drop Analysis. III. The Kjeldahl Nitrogen Determination and Non-Protein Nitrogen of Blood	13
KIRK, P. L., siehe GIBBS, G. E., und P. L. KIRK.	
KOMAROWSKÝ, A. S., und N. S. POLUEKTOFF, Über eine empfindliche Tüpfelreaktion auf Indium	227
KORENMAN, I. M., Mikrochemischer Quecksilbernachweis	223
LINDENFELD, K., Erfahrungen in der organischen Mikroanalyse	153
MARTINI, A., Neue Beiträge zur mikrochemischen Mineralanalyse. V. Serie .	233
MARTINI, A., und B. BERISSO, Über den mikrochemischen Nachweis von Quecksilber in der Nahrungsmittel- und toxikologischen Analyse . . .	236
MEYER, J., und K. HOEHNE, Über die quantitative mikroanalytische Bestimmung einiger Metalle in komplexen Salzen	187

MORTH, H., siehe PAVELKA, F., und H. MORTH.	
PAVELKA, F., und H. MORTH, Quantitative Mikro-Schnellanalyse von Reinaluminium. II. Mitteilung: Bestimmung des Siliziums und des Phosphors	239
PAVLAS, P., siehe STANĚK, V., und P. PAVLAS.	
POLUEKTOFF, N. S., siehe KOMAROWSKY, A. S., und N. S. POLUEKTOFF.	
RAPPAPORT, F., und H. ENGELBERG, Beiträge zur Jodometrie. II. Mitteilung: Mikrojodbestimmung durch ein Potenzierungsverfahren . . .	1
ROSENTHALER, L., Kristallfällung durch Aussalzung	37
SILINK, K., Contributions to the Biochemistry and Physiology of Cholesterol. A. Technique of the Microanalysis of Cholesterol. I. Communication. .	45
STANĚK, V., und P. PAVLAS, Mikroanalytische Studien über künstliche Süßstoffe. I. Saccharin	211
STEIGER, B., Über die ruthenium- und osmiumspezifische Gruppe in organischen Schwefelverbindungen	193
TIEDCKE, C., Die Mikroelementaranalyse nach Pregl. (Ein Beitrag zu ihrer exakten Ausführung.)	171
WINCKELMANN, J., Aus der Praxis der Tüpfelanalyse	203
ZAPPERT, R., siehe FEIGL, F., V. ANGER und R. ZAPPERT.	

B. SAMMELREFERATE.

	Seite
GRÜNSTEIDL, E., Die Mikromethodik in der Warenprüfung. I. Teil: 1918—1928	247
HAITINGER, M., Die Anwendung der Fluoreszenzanalyse in der Mikrochemie	321
WASITZKY, A., Kohlehydrate. II. Teil	87
C. BÜCHERSCHAU	115, 357
D. VARIA	117, 361

SACHREGISTER.

MIKROCHEMIE, BAND XVI (1934/35).

(Die *kursiv* gedruckten Schlagwörter betreffen Referate.)

	Seite
Aluminium , Quantitative Mikro-Schnellanalyse von Reinaluminium. II. Mit- teilung: Bestimmung des Siliziums und des Phosphors (F. Pavelka und H. Morth)	239
Amine , Über die Verwendung von Tüpfelreaktionen zum Nachweis von or- ganischen Verbindungen. VI. Nachweis von aliphatischen und aromati- schen Aminen mit Fluoresceinchlorid (F. Feigl, V. Anger und R. Zappert)	67
Ammoniak , Quantitative Drop Analysis. IV. The Determination of Urea and Ammonia (G. E. Gibbs and P. L. Kirk)	25
Bakterienfarbstoffe , Carotinoide, Bakterien- und Pilzfarbstoffe (H. Will- staedt)	357
Blutuntersuchungsmethoden , Einfache quantitative, klinisch-chemische Harn- und Blutuntersuchungsmethoden (E. Becher)	359
Carotinoide, Bakterien- und Pilzfarbstoffe (H. Willstaedt)	357
CH₂-Gruppen , Über die Verwendung von Tüpfelreaktionen zum Nachweis von organischen Verbindungen. VII. Nachweis reaktionsfähiger CH ₂ - und NH ₂ -Gruppen (F. Feigl und O. Frehden) :	79
Cholesterol , Contributions to the Biochemistry and Physiology of Chole- sterol. A. Technique of the Microanalysis of Cholesterol. I. Commu- nication (K. Šilink)	45
Dechema-Monographien , Band VI	358
Fluoreszenzanalyse , Die Anwendung der Fluoreszenzanalyse in der Mikro- chemie. Sammelreferat (M. Haitinger)	321
Forschungsarbeiten über Metallkunde und Röntgenmetallographie (M. v. Schwarz)	358
Einfache quantitative, klinisch-chemische Harn- und Blutunter- suchungsmethoden (E. Becher)	359



Harnstoff , Quantitative Drop Analysis. IV. The Determination of Urea and Ammonia (G. E. Gibbs and P. L. Kirk)	25
Indium , Über eine empfindliche Tüpfelreaktion auf Indium (A. S. Komarowsky und N. S. Poluektoff)	227
Jod , Beiträge zur Jodometrie. II. Mitteilung: Mikrojodbestimmung durch ein Potenzierungsverfahren (F. Rappaport und H. Engelberg)	1
Kohlehydrate . Sammelreferat (A. Wasitzky)	87
Kohlenstoff- und Wasserstoff-Bestimmung , Erfahrungen in der organischen Mikroanalyse (K. Lindenfeld)	153
Kristallfällung durch Aussalzen (L. Rosenthaler)	37
Metalle , Über die quantitative mikroanalytische Bestimmung einiger Metalle in komplexen Salzen (J. Meyer und K. Hoehne)	187
Mikroelementaranalyse nach Pregl (C. Tiedcke)	171
Mineralanalyse , Neue Beiträge zur mikrochemischen Mineralanalyse. V. Serie (A. Martini)	233
NH₂-Gruppen , Über die Verwendung von Tüpfelreaktionen zum Nachweis von organischen Verbindungen. VII. Nachweis reaktionsfähiger CH ₂ - und NH ₂ Gruppen (F. Feigl und O. Frehden)	79
Organische Mikroanalyse , Erfahrungen in der organischen Mikroanalyse (K. Lindenfeld)	153
Organische Verbindungen , Über die Verwendung von Tüpfelreaktionen zum Nachweis von organischen Verbindungen. VI und VII. (F. Feigl, V. Anger und R. Zappert, bzw. O. Frehden)	67, 79
Osmiumspezifische Gruppe , Über die ruthenium- und osmiumspezifische Gruppe in organischen Schwefelverbindungen (B. Steiger)	193
Phosphor , Quantitative Mikro-Schnellanalyse von Reinaluminium. II. Mitteilung: Bestimmung des Siliziums und des Phosphors (F. Pavelka und H. Morth)	239
Pilzfarbstoffe , Carotinoiden, Bakterien- und Pilzfarbstoffe (H. Willstaedt)	357
Polythionsäuren , Microscopic Chemical Reactions of some of the Polythionic Acids (E. M. Chamot and R. W. Brickenkamp)	121
Pyramidon , Neue Beiträge zur mikrochemischen Mineralanalyse. V. Serie, B (A. Martini)	233
Quecksilber , Über den mikrochemischen Nachweis von Quecksilber in der Nahrungsmittel- und toxikologischen Analyse (A. Martini und B. Berisso)	236
Quecksilbernachweis , Mikrochemischer Quecksilbernachweis (I. M. Kornman)	223
Reinaluminium , Quantitative Mikro-Schnellanalyse von Reinaluminium. II. Mitteilung: Bestimmung des Siliziums und des Phosphors (F. Pavelka und H. Morth)	239
Rhodan , Über die Bestimmung kleinster Rhodanmengen in biologischen Flüssigkeiten (F. Hartner)	141

Rhodium , Neue Beiträge zur mikrochemischen Mineralanalyse. V. Serie, A (A. Martini)	233
Rohrzuckergehalt , Die Bestimmung des Rohrzuckergehaltes kleinster Flüssigkeitsmengen durch Messung von spez. Gewicht und spez. Drehung (R. Beutler)	133
Röntgenmetallographie , Forschungsarbeiten über Metallkunde und Röntgenmetallographie (M. v. Schwarz)	358
Rutheniumspezifische Gruppe , Über die ruthenium- und osmiumspezifische Gruppe in organischen Schwefelverbindungen (B. Steiger)	193
Saccharin , Mikroanalytische Studien über künstliche Süßstoffe. I. Saccharin (V. Staněk und P. Pavlas)	211
Schwefelbestimmung , Erfahrungen in der organischen Mikroanalyse (K. Lindenfeld)	153
Silizium , Quantitative Mikro-Schnellanalyse von Reinaluminium. II. Mit- teilung: Bestimmung des Siliziums und des Phosphors (F. Pavelka und H. Morth)	239
Stereochemie (K. Freudenberg)	115
Stickstoffbestimmung , Quantitative Drop Analysis. III. The Kjeldahl Nitrogen Determination and Non-Protein Nitrogen of Blood (P. L. Kirk)	13
Stickstoffbestimmung , Erfahrungen in der organischen Mikroanalyse (K. Lindenfeld)	153
Süßstoffe, Künstliche , Mikroanalytische Studien über künstliche Süßstoffe. I. Saccharin (V. Staněk und P. Pavlas)	211
Tüpfelanalyse , Aus der Praxis der Tüpfelanalyse (J. Winckelmann)	203
Warenprüfung , Mikromethodik in der Warenprüfung. I. Teil: 1918.-1928. Sammelreferat (E. Grünsteidl)	247

ORIGINALABHANDLUNGEN.

BEITRÄGE ZUR JODOMETRIE.

Von

FRIEDRICH RAPPAPORT.

II. MITTEILUNG¹: MIKROJODBESTIMMUNG DURCH EIN POTENZIERUNGSVERFAHREN.

Von

F. RAPPAPORT und H. ENGELBERG.

Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der Universität
und dem S. Canning-Childe-Spital und Forschungsinstitut in Wien.

(Eingelangt am 13. Juli 1934.)

Die Bestimmung kleiner Jodmengen ist wegen der großen physiologischen Bedeutung dieses Elementes in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Bei dem Einfluß, den die quantitativen Veränderungen der Jodzufuhr, bezw. die Fixation und Ausscheidung des Jods auf das physiologische und pathologische Geschehen der Schilddrüse hat, war es naheliegend, aus Veränderungen des Blutjodspiegels auf den funktionellen Schilddrüsenzustand (Über- und Unterfunktion) Schlüsse zu ziehen. Das war auch die Ursache, daß immer neue Methoden zur Jodbestimmung im physiologischen Material ausgearbeitet wurden. Sämtliche bisher beschriebenen Methoden kämpfen mit den Schwierigkeiten, die sich einerseits aus der Geringfügigkeit des Jodgehaltes (im Blut z. B. 10 bis 20 γ %), anderseits aus der Aufarbeitung größerer Probemengen ergeben.

Um kleine Jodmengen exakt zu bestimmen, sind wir von der bekannten Tatsache ausgegangen, daß eine Überführung von Jod-Ion

¹ Mikrochemie, XIV, 119 (1933).

in Jodat durch Oxydation leicht möglich ist und letzteres nach Umsetzung mit Jodid gemäß der Reaktion:



die sechsfache Menge des ursprünglichen Jod-Ions in Form von elementarem Jod im Sinne der obenstehenden Gleichung in Freiheit setzt. Dieser Versechsfachung der zu bestimmenden Jodmenge liegt eine Reihe von Jodbestimmungsmethoden zugrunde². Wir versuchten nun, das freigemachte Jod neuerlich in Jodat zu überführen, dieses abermals auf Jod-Ion einwirken zu lassen, wodurch das Sechsunddreißigfache der ursprünglichen Jodmenge abermals in Form von freiem Jod gewonnen wird. Dieses Verfahren ließe sich theoretisch beliebig oft wiederholen und müßte letzten Endes Spuren von Jod in meßbare und sogar mit Makroflüssigkeiten titrierbare Jodmengen überführen. Eine Berechnung zeigt, daß beispielsweise der Jodgehalt in 1 ccm einer n/100-Jodlösung, zur fünften Potenz vergrößert, statt des ursprünglich notwendigen 1 ccm 7776 ccm n 100-Natriumthiosulfat verbrauchen würde.

Während unsere diesbezüglichen Versuche im Gange waren, ist von F. EMICH³ eine sehr bemerkenswerte und für das Prinzip quantitativer mikrochemischer Bestimmungen richtunggebende Abhandlung erschienen. In dieser verweist EMICH u. a. auf die Möglichkeit, einen zu bestimmenden Stoff „schrittweise solchen stöchiometrischen Umwandlungen auszusetzen, die sein Gewicht nach und nach (bis zur entsprechenden Meßbarkeit) erhöhen“. Hierfür hat EMICH einige Beispiele angegeben und je nach der Art der Vervielfältigung und nach der von der jeweiligen Umsetzung abhängigen Vergrößerungszahl z. B. Multiplikations- und Potenzierungsverfahren unterschieden. Ein derartiges Potenzierungsverfahren stellt auch unsere Jodbestimmung dar. In Hinblick auf die von EMICH erkannte Tragweite derartiger

² L. W. WINKLER, Ztschr. analyt. Chem., **39**, 85 (1900).

L. W. WINKLER, Ztschr. angew. Chem., **281**, 496 (1915).

T. LEIPERT, Pregl-Festschrift der Mikrochemie, **1929**, 266.

T. LEIPERT, Biochem. Ztschr., **261**, 436 (1933).

F. VIEBÖCK und C. BRECHER, Pharm. Monatshefte, **10**, 92 (1929).

³ F. EMICH, Journal Indian Chem. Soc. P. C. Ray Seventieth Birth & Day Commemoration Volume 1933. S. 189. Mikrochemie, **XIII**, 283 (1933).

Potenzierungsverfahren und mit Rücksicht auf die vielfache Auswertungsmöglichkeit in der Jodometrie (s. I. Mitteilung, I. c.), haben wir uns bemüht, unser Verfahren zu einer exakten Methode auszuarbeiten, trotz der zahlreichen Schwierigkeiten, die vor allem darin liegen, daß bei solchen Potenzierungsverfahren auch mit einer gleichsinnigen Potenzierung sämtlicher Fehlerquellen zu rechnen ist; auf die Wichtigkeit der Beachtung und Eliminierung von Fehlerquellen hat deshalb EMICH in seinen Ausführungen ganz besonders verwiesen.

Wir beschränken uns darauf, im nachfolgenden lediglich eine Arbeitsmethode zu beschreiben, durch die es möglich ist, auf einfache und sichere Weise bei Jodbestimmungen zu einwandfreien Resultaten zu gelangen. Von einer Aufzählung aller Fehlerquellen, die zu überwinden waren, sehen wir ab und beschränken uns darauf, nur solche Maßnahmen zu unterstreichen, deren Nichtbeachtung zu fehlerhaften Ergebnissen führen könnte.

Prinzip der Methode.

Das zu bestimmende Jod muß als Jodid vorliegen; nötigenfalls ist durch geeignete Maßnahmen eine Überführung von Jodat oder freiem Jod in Jodid zu bewerkstelligen (z. B. durch alkalische Sulfitlösung). Die Probelösung wird zunächst durch verdünnte Phosphorsäure bei Gegenwart von Methylrot als Indikator angesäuert, mit Bromeisessig oxydiert und das überschüssige Brom durch gelinde Erwärmung im Vakuum entfernt. Die Umsetzung des gebildeten Jodats mit Jodid zu freiem Jod erfolgt durch Zusatz von Cadmiumjodid und Kaliumbisulfat. Das gebildete freie Jod wird im Wasserdampfstrom abdestilliert und in alkalischer Sulfitlösung aufgefangen. Nach dem Ansäuern mit Phosphorsäure wird in der früher geschilderten Weise mit Brom oxydiert. Dieses Verfahren konnte bis zur fünften Potenz von uns wiederholt werden.

Die Verwendung von Phosphorsäure ist deshalb erforderlich, weil durch ihren Zusatz bis zum Farbumschlag von Methylrot gerade jenes pH geschaffen wird, bei welchem eine quantitative Oxydation des freien Jod durch Brom zu Jodat gewährleistet wird. Bei diesem pH wird auch eine Einwirkung von Jodat auf Bromid unter Rückbildung von Jod praktisch vermieden.

Cadmiumjodid (Schuchardt) ist deshalb zu verwenden, weil es im Gegensatz zu Kaliumjodid hitzebeständig ist.

Kaliumbisulfat (Schuchardt) wird von uns statt Schwefelsäure verwendet, weil es für die Jodat-Jodid-Reaktion die gerade notwendige und ausreichende Azidität besitzt. Bei Verwendung von Schwefelsäure erhielten wir in Leer- und Jodidbestimmungen stets zu hohe Werte.

Apparatur.

Gemäß dem früher geschilderten Prinzip der Potenzierungsmethode sind für die Durchführung der Bestimmung gewisse apparative Behelfe erforderlich, die im Nachstehenden beschrieben werden⁴.

a) Bromierungsapparatur (Abb. 1).

Das zur Oxydation des Jods zu Jodat erforderliche Brom wird im Überschuß verwendet und das unverbrauchte Brom im Wasserdampfstrom unter vermindertem Vakuum entfernt.

Zur Entwicklung des Wasserdampfes dient ein 1-Liter-Rundkolben (A) aus Jenaer Glas; zur Vermeidung des Siedeverzuges dient nach der Vorschrift von FOLIN und SVEDBERG⁵ ein in der Mitte und an einem Ende zugeschmolzenes Glasrohr (m), das in den Dampfentwickler mit dem offenen Ende nach unten eingebracht ist. Von diesem Wasserdampfentwickler, der mit einem Glasschliff versehen ist, geht einerseits ein abgebogenes Rohr (c) ab, das in einen zweiten zur Hälfte mit Wasser gefüllten Rundkolben (B) eintaucht, anderseits führt ein Glasrohr zum Eintauchrohr (d), dessen unteres Ende kugelig erweitert und durch zahlreiche Lücken perforiert ist. Zur Aufnahme der Probelösung dient ein birnenförmiger 250-ccm-Kolben (E), der ebenfalls mittels Glasschliff angesetzt wird. Zwischen Wasserdampfentwickler (A) und der Vorlage (E) ist ein Parallelweghahn (g) eingeschaltet, dessen obere Bohrung die Verbindung zwischen den beiden Kolben herstellt, während die untere die Vorlage (E) mit der Außenluft unter Zwischenschaltung eines Natronkalkrohres — zur Absorption etwaiger Brom-

⁴ Diese sind fertig bei der Fa. Paul Haack, Wien, IX., Garelligasse, zu beziehen.

⁵ Journ. of biol. Chemistry, 88, 77 (1929).

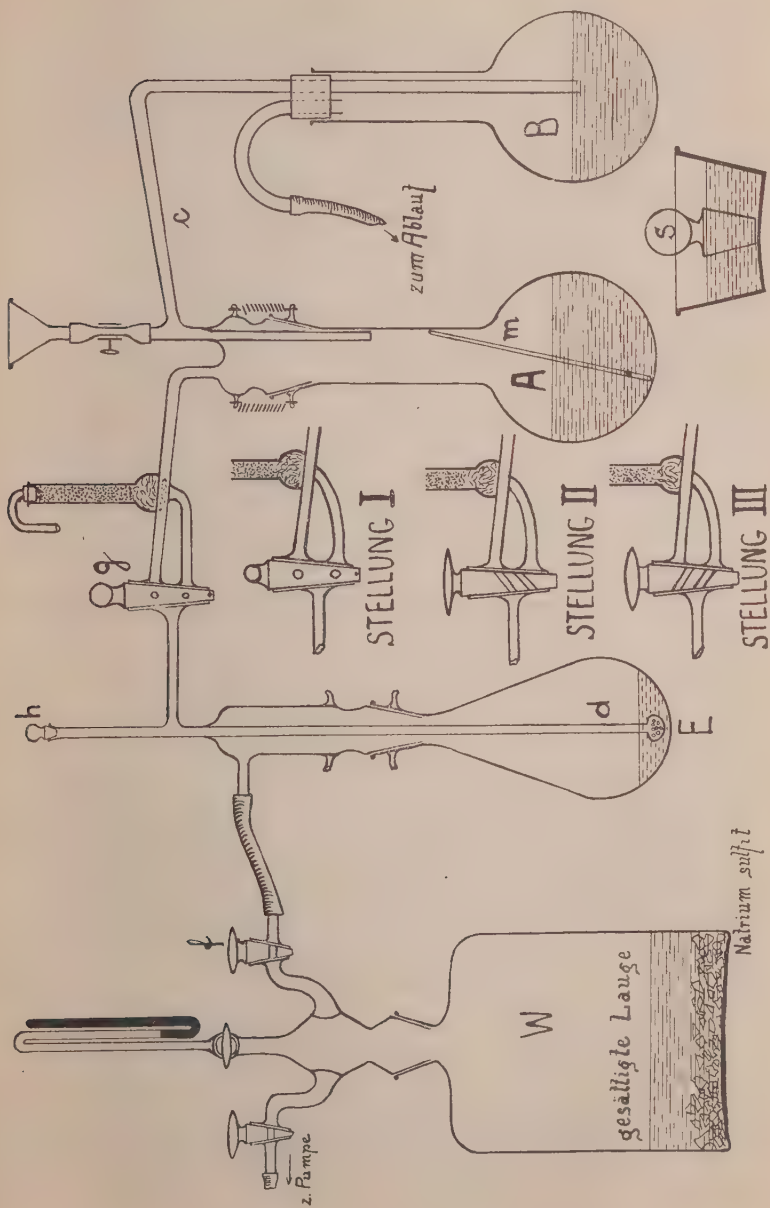


Abb. 1.

dämpfe in der Luft — verbindet. Zur feineren Einstellung besitzt die obere Bohrung an ihren Enden zwei Schlitze. Zur Herstellung eines Unterdruckes wird eine Wasserstrahlpumpe unter Zwischenschaltung einer mit gesättigter Natronlauge und festem Natriumsulfat gefüllten Flasche (W) mit Manometer verwendet. Vor Beginn wird der Hahn in Stellung I gebracht und das Wasser im Dampfentwickler (A) zum Sieden erhitzt; das Gefäß mit der Probe wird an die Apparatur angeschlossen, wobei das Eintauchrohr (d) in die Flüssigkeit eintaucht. Bei einem Manometerdruck von 20 mm wird der Hahn durch vorsichtiges Drehen in Stellung II gebracht; es darf sich die Vorlage bei einer kräftigen Blasenentwicklung nicht über Handwärme (30°) erhitzen. Es wird durch 4 Minuten nach Verschwinden der Braunfärbung der Apparat in dieser Stellung belassen, dann wird der Hahn (f) geschlossen, und Hahn (g) durch vorsichtiges Drehen in Stellung III gebracht: dadurch wird gleichzeitig das Vakuum aufgehoben. Dann wird die Vorlage etwas gesenkt, das Eintauchrohr von oben nach Lüften des Stöpsels (h) und von außen mit redestilliertem Wasser nachgewaschen.

Die ganze Apparatur befindet sich unter einem gut ziehenden Abzug.

b) Destillationsapparat (Abb. 2).

Das aus Jodat und Jodid freigemachte Jod wird im Wasserdampfstrom destilliert und in einer alkalischen Natriumsulfatvorlage aufgefangen. Die Apparatur lehnt sich im wesentlichen an den Destillationsapparat nach KJELDAHL (PREGL) an. Am oberen Ende des Wasserdampfentwicklers (A) — ein 1-Liter-Rundkolben, der mit destilliertem Wasser gefüllt wird — ist ein T-Stück (mit Schliff) befestigt, dessen horizontaler Schenkel mittels eines Gummischlauches mit dem Einleitungsrohr (D) in Verbindung steht und mit dem vertikalen Schenkel mit der Luft kommuniziert. Doch muß darauf geachtet werden, daß die Verbindung der beiden horizontalen Schenkel Glas an Glas erfolgt. Der vertikale Schenkel dient zum Einbringen von Wasser und wird mittels Schlauch und Klemme abgeschlossen. Der Destillationskolben besteht aus einem birnenförmigen 250-ccm-Rundkolben (E), der mittels Glasschliff (zu dem mehrere Kolben passen) auf das Einleitungsrohr angesetzt

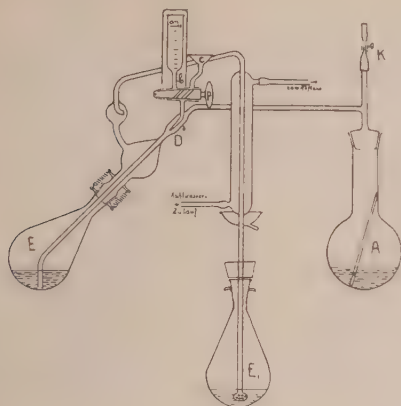


Abb. 2.

und mittels Federn befestigt wird. An das Dampfeinleitungsrohr ist ein Parallelweghahn (p) angeschmolzen, dessen eine Bohrung zu einem kleinen Trichter (c), der mit einem Uhrglas bedeckt wird, die andere zu einem 10 ccm fassenden Zylinder, der in Abständen von je 0,5 ccm unterteilt ist, führt. Der Zylinder ist mit einer Eprouvette aus dunklem Glas zum Schutz vor Licht und Staub bedeckt. Das Destillat wird durch Passage eines kleinen Kühlers kondensiert. Das Abtropfrohr ist kugelig erweitert und durch mehrere kleine Lücken perforiert. Zur Aufnahme der Vorlage dient ein 250-ccm-Birnkolben, der auf einen am Abtropfrohr angebrachten Gummistopfen angesetzt wird. Der Stopfen dient nicht zur Befestigung des Vorlagekolbens, sondern nur zur Vermeidung einer Beschädigung des kugeligen Endes des Eintauchrohres, bezw. des Kolbens durch zu kräftiges Aufsetzen. Vor Beginn jeder Destillationsserie wird der Apparat gut ausgedämpt.

Reagenzien.

1. Absorptionsflüssigkeit:

- a) Natronlauge: 8 g Ätznatron pro analysi (Schuchardt) werden in zirka 200 ccm Wasser gelöst.
- b) Natriumsulfit: 4 g wasserfreies Natriumsulfit (beschränkte Zeit haltbar) werden in zirka 200 ccm Wasser gelöst.

Vor Gebrauch werden 25 Teile der Lösung a mit 15 Teilen der Lösung b gemischt.

2. Verdünnte Phosphorsäure: 10 ccm syrupöse Phosphorsäure werden mit Wasser auf 100 ccm verdünnt.
3. Indikator: 15 mg Methylrot werden in 10 ccm der Natronlauge 1 a gelöst und mit Wasser auf 1000 ccm aufgefüllt.
4. Bromeisessig: 25 g Brom werden in 100 ccm reinstem Eisessig gelöst.
5. 5% ige Kaliumbisulfatlösung (hergestellt aus Kaliumbisulfat pro analysi, mit Garantieschein Schuchardt, eisenfrei).
6. Cadmiumjodidlösung: 0,5 g Cadmiumjodid (abgefüllt von der Firma Schuchardt in kleinen Fläschchen, aufgehoben im leeren Vakuumexsikkator) werden in 25 ccm Wasser aufgelöst⁶.
7. Doppelt destilliertes Wasser⁷.
8. Kaliumjodid, fest.
9. 20% ige Schwefelsäure.
10. n/100-, bzw. n/200-Natriumthiosulfat.
11. 0,25% ige Stärke.

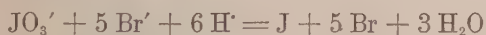
Arbeitsgang.

In den Destillationskolben (E) (s. Apparatur) werden 2 ccm alkalischer Natriumsulfatlösung (1) und die entsprechende Menge der zu untersuchenden Jodlösung eingebracht. Es werden dann 2 Tropfen des Indikators (3) und soviel Phosphorsäure (2) (beide Lösungen am besten aus Tropfflaschen) zugesetzt, bis die auftretende schwachrosa Färbung nicht mehr verschwindet. Der Kolben

⁶ Für die Ausarbeitung des Verfahrens waren eingehende Untersuchungen über die vom verwendeten Jodid stammenden Fehlerquellen erforderlich. Vor allem mußte auf vollkommene Jod- und Jodatfreiheit des Jodids geachtet werden. Erst ein von der Firma Schuchardt hergestelltes CdJ_2 entsprach in bezug auf Reinheit allen Anforderungen. Von dieser Firma wird das CdJ_2 in Flaschen à 0,5 und 1 g geliefert, das sind jene Mengen, die jeweils für einen Versuch zur Verwendung gelangen. Trotzdem ist es unerlässlich, vor Durchführung der Bestimmung mit der verwendeten Ampulle einen Leerversuch anzustellen. Es darf hierbei bis zur gewünschten Potenz nicht der geringste Blindwert auftreten; ist dies nicht der Fall, dann muß eine neue Ampulle, die den oben beschriebenen Anforderungen entspricht, verwendet werden.

⁷ F. RAPPAPORT, Mikrochemie, XV, 302 (1934).

wird mit einem eingeschliffenen Glasstöpsel (S) (s. Abb. 1), der vorher mit etwas redestilliertem Wasser abgespült wurde, verschlossen. Die Bromierung, die in einem anderen Raum⁸ und wömmöglich von einer anderen Person durchgeführt werden muß, erfolgt durch tropfenweises Zusetzen essigsaurer Bromlösung (4) bis zum Auftreten einer beständigen Braunfärbung. Muß die Bromierung vom Untersucher durchgeführt werden, so ist es unbedingt notwendig, daß er nachher seine Hände in einer wäßrigen Natriumsulfitlösung wäscht. Der Kolben mit der bromierten Probe wird an den Bromierungsapparat, der vorher angeheizt wurde und dessen Hahn sich in Stellung I befindet, angesetzt und der Stopfen des Kolbens in eine alkalische Natriumsulfitlösung geworfen. Hat das Wasser im Wasserdampfentwickler zu sieden begonnen und wurde ein Unterdruck von 20 mm Hg erreicht, so wird der Hahn (g) durch vorsichtiges Drehen in Stellung II gebracht, wobei darauf zu achten ist, daß bei einer kräftigen Blasenbildung die Vorlage nicht über Handwärme (30°) erhitzt wird. Diese Maßnahme ist deshalb erforderlich, da bei höheren Temperaturen die Reaktion im Sinne der Gleichung:



wenigstens teilweise vor sich gehen kann⁹. Nach der Entfärbung wird durch weitere 4 Minuten (Sanduhr) Wasserdampf durchgeleitet, dann wird der Hahn (f) geschlossen und Hahn (g) in Stellung III gebracht. Der Kolben wird leicht gesenkt und das Eintauchrohr, wie früher beschrieben, abgespült, dabei darf jedoch beim Nachwaschen von oben kein Wasser über die Außenwände in den Kolben gelangen. Ist der Oxydationsprozeß (erste Potenz) vollendet, so werden 2,5 ccm Kaliumbisulfat (5) zugesetzt und der Kolben an den Destillationsapparat, in dem das Wasser im Kolben (A) zum Sieden erhitzt wurde (Benetzung des Schliffes mit Wasser, Spiralfedern), angeschlossen. Zugleich wird auch die Vorlage — 2 ccm der Natriumsulfitmischung (1) und etwas Wasser enthaltend — an den Aparat so angesetzt, daß das Abtropfrohr in die

⁸ Diese Vorsichtsmaßregel ist deshalb erforderlich, um bei der weiteren Arbeit Störungen durch freies Brom in der Luft des Analysenraumes zu vermeiden.

⁹ Siehe auch J. L. GOLDBERG, Mikrochemie, XIV, 161 (1933).

Flüssigkeit eintaucht. Aus dem Zylinder, der vorher mit Cadmiumjodidlösung gefüllt wurde, wird 1 ccm in den Destillationskolben abfließen gelassen. Nachgewaschen wird vom Trichter (c) aus mit etwa 10 ccm Wasser, wobei etwas Wasser im Trichter gelassen werden muß. Hierauf wird die Klemme (k) geschlossen und durch 3 Minuten vom Zeitpunkt des Übergehens des kondensierten Wassers destilliert. Die Kühlung wird jetzt ausgeschaltet, und zwar so lange, bis das Abtropfrohr (d) unter dem Kühler sich warm anfühlt. Dann wird der Kolben gesenkt, das Abtropfrohr mit redestilliertem Wasser abgespült, die Kühlung aufgedreht und durch weitere 2 Minuten destilliert, wobei das Destillat frei in die Vorlage abtropft. Die Klemme (k) wird geöffnet, der Bunsenbrenner abge-

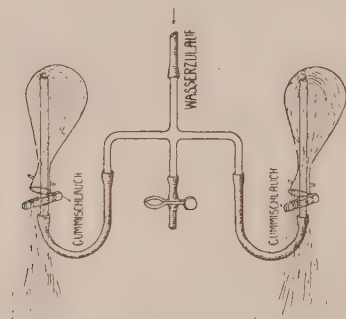


Abb. 3.

dreht und die Vorlage (E₁) vom Stativ heruntergenommen. Nach Zusatz von 2 Tropfen Indikator und Ansäuern mit Phosphorsäure wird, wie oben beschrieben, bromiert und das überschüssige Brom im Bromierungsapparat entfernt (zweite Potenz). Es kann jetzt, wenn bei der Destillation ein Übergang von elementarem Jod in die Vorlage beobachtet wurde, nach Zusatz von 1 bis 2 ccm Schwefelsäure (9) und einem Körnchen Kaliumjodid mit n/100-, bzw. n/200-Natriumthiosulfat auf strohgelb und nach Zusatz von Stärke auf farblos titriert werden.

Waren keine oder nur ganz geringe Jodmengen bei der ersten Destillation übergegangen, erkennbar an der Gelbfärbung der zu destillierenden Flüssigkeit, so wird nicht titriert, sondern neuerdings,

wie oben beschrieben, destilliert, die Vorlage angesäuert, bromiert und das überschüssige Brom entfernt (dritte Potenz).

In analoger Weise kann noch eine dritte und vierte Destillation, entsprechend einer vierten und fünften Potenzierung, durchgeführt werden. Nach jeder Destillation werden der Vorlagekolben und Destillationskolben entfernt und das Dampfleitungsrohr von oben her durch den Trichter (c) mehrmals mit redestilliertem Wasser nachgewaschen. Der Inhalt des Destillationskolbens wird weggeschüttet und der Kolben mit etwas Leitungswasser ausgewaschen und sodann auf die Spülvorrichtung (s. Abb. 3) aufgesetzt.

Zur Berechnung des Jodgehaltes aus der Menge des verbrauchten Thiosulfats bedient man sich der in der Tabelle I angegebenen Umrechnungsfaktoren, deren Größe von dem Grade der Potenzierung abhängig ist. Es ist selbstverständlich, daß man zu jeder Serie von Vollbestimmungen einen Blindwert durchführt, der bis zur fünften Potenz keine positive Jodreaktion nach Zusatz von Kaliumjodid, Säure und Stärke zeigen darf.

Tabelle I.
(Umrechnungstabelle.)

Potenz	1 ccm n/100 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ entspricht	1 ccm n/200 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ entspricht	Vergrößerung
0	1269,2 γ J	634,6 γ J	1fache
1	211,53 γ J	105,76 γ J	6fache
2	35,26 γ J	17,63 γ J	36fache
3	5,876 γ J	2,938 γ J	216fache
4	0,9793 γ J	0,4896 γ J	1296fache
5	0,1632 γ J	0,0816 γ J	7776fache

Beleganalysen.

1,6278 g chemisch reinstes Kaliumjodid wurden in 1 Liter Wasser gelöst. 1 ccm dieser Lösung, entsprechend 1244 γ Jod, wurde in einem Meßkolben auf 100 ccm mit Wasser verdünnt (Lösung A). 1 ccm dieser Lösung enthält 12,44 γ Jod.

10 ccm der Lösung A, entsprechend 124,4 γ Jod, wurden in einem Meßkolben mit Wasser auf 100 ccm verdünnt (Lösung B). 1 ccm dieser Lösung enthält 1,244 γ Jod.

Tabelle II.

Potenz	n/100 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ Verbrauch in ccm	Gegebene Jodmenge	Gefundene Jodmenge
2	3,52	10 ccm Lösung A = 124,4 γ J	124,11 γ J
2	1,74	5 ccm Lösung A = 62,2 γ J	61,35 γ J
2	1,05	3 ccm Lösung A = 37,32 γ J	37,02 γ J
3	10,5	5 ccm Lösung A = 62,2 γ J	61,70 γ J
3	6,35	3 ccm Lösung A = 37,32 γ J	37,31 γ J
3	4,20	2 ccm Lösung A = 24,88 γ J	24,67 γ J
3	2,10	1 ccm Lösung A = 12,44 γ J	12,34 γ J
3	1,05	5 ccm Lösung B = 6,22 γ J	6,17 γ J
4	6,28	5 ccm Lösung B = 6,22 γ J	6,15 γ J
4	3,79	3 ccm Lösung B = 3,73 γ J	3,71 γ J
4	2,45	2 ccm Lösung B = 2,48 γ J	2,40 γ J
4	1,28	1 ccm Lösung B = 1,24 γ J	1,25 γ J
5	7,55	1 ccm Lösung B = 1,24 γ J	1,23 γ J

Nach unseren bisherigen Versuchen gelingt nach der vorstehend beschriebenen Methode die Potenzierung von Jodmengen bis zur fünften Potenz, sofern die ursprüngliche Jodmenge nicht unter 1 γ liegt. Bei kleineren Jodmengen werden schwankende Werte erhalten.

Über die Anwendung dieses Potenzierungsverfahrens zur Bestimmung von anorganischen und organischen Stoffen, die auf jodometrischem Wege ermittelbar sind (Brom, Chrom, Mangan, Kupfer, Calcium, Cer, Ammoniak, Oxalsäure, Zucker usw.), sowie über die Bestimmung von Jodmengen unter 1 γ sind Versuche im Gange, über deren Ergebnisse wir demnächst berichten werden.

QUANTITATIVE DROP ANALYSIS.

III. THE KJELDAHL NITROGEN DETERMINATION AND NON-PROTEIN NITROGEN OF BLOOD¹.

By

PAUL L. KIRK.

From the Division of Biochemistry, University of California Medical School,
Berkeley.

(Eingelangt am 9. Juli 1934.)

In the analysis of biological materials both in research and industry the determination of nitrogen by the method of Kjeldahl is of the greatest importance. In considering this method for adaptation to the drop scale of analysis it appeared to offer a new type of technique from that described by P. L. KIRK², and since the development of drop scale methods in this laboratory aims to be entirely general in its application, it seemed especially desirable to adapt this method to the drop scale. Since one of the most obvious applications of this method would be to the determination of non-protein nitrogen in blood, the method is extended here to meet this requirement. Moreover, the operations involved in this method would seem to be easily adaptable to the determination of ammonia and of urea and possibly of amide nitrogen. Since it has been previously found^{2, 3, 4} that titrations of acid and base were easily possible on this scale, the problem resolved itself to the development of digestion and distillation apparatus and technique. In the ordinary micro Kjeldahl method⁵ either silver or block tin

¹ Aided by a grant from the Research Board of the University of California.

² Mikrochemie, **XIV**, 1 (1933).

³ K. LINDERSTRÖM-LANG and H. HOLTER, Ztschr. physiol. Chem., **220**, 5 (1933).

⁴ K. SCHWARZ, Mikrochem., **XIII**, 1 (1933).

⁵ F. PREGL, Quantitative Organic Microanalysis, 2nd English Edition, Philadelphia, 1930.

condensers are used. This is not practical in the apparatus here described. It has been shown by E. SCHULEK and G. VASTAGH⁶ that glass condensers do not introduce appreciable errors into either the macro or micro Kjeldahl methods, but that rubber connections are a source of difficulty. Consequently no rubber connections are used here in the distillation train itself.

LINDERSTRÖM-LANG and HOLTER³ have devised a similar technique for the determination of ammonia and urea. The accuracy which they achieve is very satisfactory on extremely small samples, but their method of distilling the ammonia is markedly slower than the method here described, and their apparatus is more costly and difficult to construct. The apparatus used here is almost exclusively of glass and rubber which can be easily constructed by a glassblower of moderate skill.

In the expression of results, the term ϵ has been used to designate the micro-equivalent, i. e. a millionth of an equivalent. This is entirely in line with the common convention of using μ to designate a millionth of a meter and γ to designate a millionth of a gram, as well as with the use of λ to designate a millionth of a liter as was proposed by the author². The additional justification for the simplification obtained by introducing the use of the letter epsilon in this connection is that much of the data here reported is in fractions of a micro-equivalent. A useful relationship in calculation of results of this order of magnitude is that the number of λ multiplied by the normality is equal to the number of ϵ , just as the number of ml. multiplied by normality equals milliequivalents.

Experimental.

Apparatus: The most important part of the apparatus, that in which the distillation is carried out is shown in Figure 1. A is a combination air washer and pressure regulator. Air entering the top bubbles out of the lower end of the inside tube through a layer of concentrated sulfuric acid to remove any ammonia which may be present. It is entrapped by the middle tube until the level of the acid inside this tube reaches the lower end after which the excess escapes through the vent in the stopper. The pressure is

⁶ Ztschr. analyt. Chem., **92**, 352 (1933).

regulated by raising or lowering the inside tubes by sliding them in the stopper. This device is attached to a source of compressed air which is used in aeration of the ammonia through the apparatus. B is a steam generator having in the bulb a capacity of about 50 ml. It is heated by an ordinary micro burner. C is a steam trap

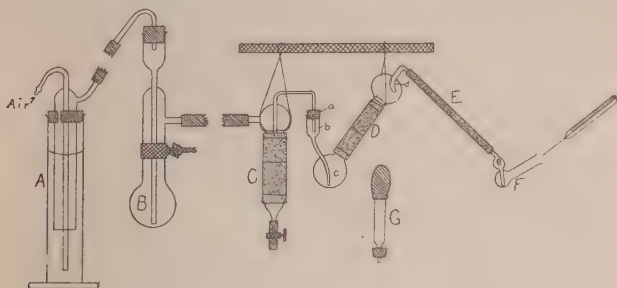


Figure 1. Distillation apparatus. $\frac{1}{8}$ natural size.

10 cm. long and 1.5 cm. in diameter, having a rubber outlet tube and screw clamp on the bottom for drainage. The top exit is made from tubing having 4 mm. outside diameter which fits through a small rubber stopper *a*. This is inserted in the filling funnel *b* which is an integral part of the distillation flask *D*. The flask *D* has a boiling chamber *c* of about 5 ml. capacity and a trap *d*. The exit tube of *d* is again made from 4 mm. outside diameter tubing which also forms the condenser *E*. This terminates in a bulb *e* connecting through a ring seal to the interior of the receiver *F* which consists of a tube 40 mm. long and 10 mm. diameter on which is a bulb 12 mm. in diameter containing the dipping outlet tube.

Straight portions of the apparatus as at *C* and *D* are wrapped with asbestos paper to minimize heat loss, and the condenser tube *E* is wrapped with several layers of filter paper which when moistened with water from a wash bottle serves as the cooling agent for the condenser. *G* is an ordinary medicine dropper on the constricted end of which is fitted a small rubber stopper which fits the filling funnel on the distillation flask.

Figure 2 shows the digestion tubes. The sample, sulfuric acid and a catalyst are introduced with capillary pipettes previously

described^{2,7} and the digest is transferred to the filling funnel *b* by rinsing through the small tube which is 4 mm. in outside diameter. These tubes are placed in wire cradles from which they are easily removed, these being suspended from a horizontal rod. In transferring concentrated sulfuric acid with capillary pipettes it is highly desirable to blow an additional bulb just above the zero mark to prevent droplets of the acid from collecting by drainage from the walls and running up the pipette ahead of the sample into



Figure 2. Digestion tube. $\frac{1}{2}$ natural size.

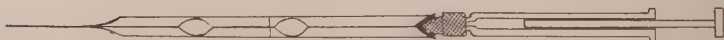


Figure 3. Capillary pipette adapted for measurement of concentrated sulfuric acid. $\frac{1}{2}$ natural size.

the syringe. Such an arrangement is shown in Figure 3. The capacity of the pipette is conveniently about 0.1 ml. this being about the optimum amount of sulfuric acid to use in the digestion.

Heat must be applied to the digestion tubes, the distillation flask and the receiver at some stage of the determination. This is most simply done by means of a fine micro burner such as the "Dachshund" burner described by PREGL⁵ which operates well on artificial but not on natural gas. The gas available being natural it was necessary to devise a small burner for it, such as shown in Figure 4. The entire burner is constructed from Pyrex glass. The jet *j* is so drawn that when on full gas pressure the flame is not more than 10 mm. in height. Air is admitted through vents *l* in the legs. A chimney *k* is fitted loosely on the top of the burner to protect it from draughts of air and it also must contain vents *m*. The tip *n* is about 2 to 3 mm. in inside diameter. These burners are not difficult to make, they burn any type of gas, and replace in a very

⁷ P. L. KIRK and RODERICK CRAIG, J. Lab. Clin. Med., 18, 81 (1932).

satisfactory way the rather costly "Dachshund" burner. They are likewise to be highly recommended for many additional heating requirements in the microchemical laboratory.

Capillary pipettes in whatever sizes may be useful must be provided for sampling. One additional is necessary for measuring the standard acid into the receiver. This should have a capacity of about 40 λ . though the exact size is unimportant. The pipette

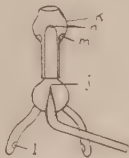


Figure 4. Micro glass burner. $\frac{1}{4}$ natural size.

for measuring the sulfuric acid has already been described. A pipette for measuring the strong caustic is conveniently made by drawing a tip on a piece of 6 or 7 mm. tubing. This may be provided with a rubber tube or a rubber bulb for filling without danger of sucking the solution into the mouth. A rough calibration of the amount necessary to neutralize the amount of sulfuric acid used and add a small excess is made on the tube. Phenolphthalein should be definitely changed to red and an excess over the amount of caustic necessary to do this causes no difficulty unless foaming should be encountered. A similar pipette is used for adding alcohol.

Two or three small casseroles or similar vessels made from glass are useful for containing wash water for rinsing the pipettes. One may be used exclusively for the sulfuric acid pipette to avoid contaminating the wash water with this acid. Another for containing diluted Superoxol is necessary if this material is used.

A rack for holding the pipettes is desirable to prevent them from being contaminated by material on the table top. Such holders may be bought in the form of porcelain plates having a series of parallel grooves, or they may be conveniently constructed from small diameter glass rod.

A glass manifold is useful for attaching a number of burners. One large micro burner is needed for the steam generator, one small

glass or "Dachshund" burner for the distillation flask and receiver, and as many additional as is desired for digesting the samples. A small wash bottle with a volume of about 50 ml. having a capillary outlet tip drawn on a 1 ml. capillary tube and having a 10 to 20 ml. rubber bulb to provide pressure is very useful.

The burette which is most convenient for the final titration is the universal type illustrated in Figure IV of the article by KIRK².

Reagents: 1. Sulfuric acid. Commercial c. p. grade sulfuric acid is redistilled in a small all-glass still which is constructed from glass tubing. The nitrogen content of this acid is entirely negligible.

2. Copper sulfate solution. This is made by dissolving c. p. copper sulfate in water in 0.1 per cent solution. If proteinaceous or other difficultly digested materials are to be analysed a mercuric sulfate solution of comparable strength may be used, or alternatively, some form of selenium. Selenium oxychloride may also be mixed with the sulfuric acid instead of using a separate solution. The amount of catalyst, whether it be copper, mercury or selenium, should not greatly exceed the amount of nitrogen to be determined and it is preferably added in solution from a pipette in order to keep constant any nitrogen which it may contain.

3. Strong caustic solution. Either a 50 per cent or a saturated solution of sodium hydroxide must be available for neutralizing the sulfuric acid. Ordinary "Kjeldahl alkali" is satisfactory though more confidence is gained by use of a c. p. caustic. Some sodium thiosulfate must be added to this reagent if mercury is employed as catalyst.

4. Standard hydrochloric acid. A solution of approximately 0.05 N hydrochloric acid must be prepared. Exact standardization is not necessary though it is well to know the ratio of acid to the standard alkali used. Methyl red is added to the acid in amounts sufficient that the endpoint of the titration with standard alkali may be observed. This will be used in constant amount since it is added to the acid.

5. Standard sodium hydroxide solution. An accurately standardized sodium hydroxide solution approximately 0.05 N should be prepared. This should contain as little carbonate as practicable, though solutions prepared from the clear saturated caustic soda solution are satisfactory.

6. Alcohol. A small flask of 95 per cent alcohol is provided since this must be used in the distillation.

7. Superoxol or Perhydrol. This is used for clearing the digest in case of difficultly combustible materials.

8. Clean absorbent cotton. This is used for wiping the tips of the pipettes, burette, etc., and for fine adjustment of the meniscus in the pipettes.

Analytical procedure.

Digestion: A capillary pipette-full of a solution containing nitrogen is measured into the digestion tube, taking precautions that all solution adhering to the exterior of the tip is removed with absorbent cotton. The pipette is rinsed into the tube with one filling of water followed by one of copper sulfate solution or other catalyst in case copper sulfate is not used. The size of the pipette should be such that the sample will contain between 3 and 20% of nitrogen. About 0.1 ml. of the concentrated sulfuric acid is added from the sulfuric acid pipette without rinsing. The mixture is heated very carefully with the glass or "Dachshund" burner until the water is driven off, after which it is heated more strongly for about 5 minutes. Many materials are completely digested in this time, but compounds containing the benzene ring and some others will be only charred at this stage, imparting a brownish tinge to the digest. In this case the solution is allowed to cool somewhat and about 15% of Perhydrol or Superoxol diluted with 2 volumes of water is added cautiously. The digest is then heated slowly until ebullition has ceased and then more strongly until the digest is clear and about two minutes more. In most cases ten minutes suffices for the complete digestion.

Distillation: The distillation apparatus must be clean, and when new or when it has stood unused for some time, it must be thoroughly steamed out by heating the water in the steam generator before running a distillation. Before charging the distillation flask, air is turned on until the pressure regulator is full and the excess bubbling off through the top vent. All burners are lighted and pushed aside. A pipette-full of standard acid is measured into the receiver taking the usual precaution of wiping the tip, and rinsing with two fillings of water. The contents of the digestion tube is transferred to the filling funnel rinsing with a few drops of water.

The solution which is held in the small outlet tube is forced into the funnel by pressing on the open end of the digestion tube with the finger, touching off the drop on the side of the funnel. The tube is righted, a little water added from the wash bottle and whirled to rinse. This is added to the filling funnel as before the solution being also forced down into the distillation flask by pressure with the finger. This is repeated about four or five times to obtain complete transfer. Five or six small drops of alcohol are added to the funnel from the capillary alcohol pipette and the funnel is rinsed with a little water from the wash bottle this being forced in as usual with the finger. The screw clamp between the pressure regulator and the steam generator is now opened sufficiently to allow about three bubbles every two seconds, which can be observed in the water in the steam generator. The necessary amount of strong alkali is now added to the filling funnel and forced down with the finger. The bulb of the distilling flask should not be more than half full when completely charged. The rubber stopper is placed in the filling funnel which should cause the air stream to bubble through the contents of the distillation flask mixing the contents. If this does not immediately take place, the flask is shaken to mix the contents first. The filter paper around the condenser tube is now thoroughly moistened with water from the wash bottle and the burner placed under the distillation flask. The heating is gentle at first, maintaining the temperature of the solution just under boiling for two or three minutes. This aeration from the hot solution carries over nearly all of the ammonia. Shortly the alcohol distills up the sides of the flask and is refluxed, rinsing down droplets of water which otherwise dissolve and retain traces of the ammonia. The temperature is raised to a brisk boil, driving over the last traces of ammonia and thoroughly rinsing the condenser. The amount distilled should conveniently fill the bulb of the receiver. This will amount to about 0,2 or 0,3 ml. A greater amount dilutes the acid until the endpoint is somewhat obscured. The flame under the distillation flask is now removed, the air stream preventing any sucking back of the standard acid. The burette is now filled with the standard alkali solution. By the time this is done the contents of the distillation flask is considerably cooled. The rubber connection is broken at the filling fun-

nel and the medicine dropper with the stopper attached is inserted instead. The burette tip is then inserted into the distillate in the receiver and the titration is performed. Stirring is accomplished by alternately squeezing and releasing the bulb of the medicine dropper. The end point is the production of a canary yellow color. Just before this is reached the contents of the receiver is boiled using the glass burner and stirring constantly as described. This removes any dissolved carbon dioxide. Following the boiling the titration of the hot solution is immediately completed.

The blank value is determined by running the complete determination using distilled water instead of the nitrogenous sample. This will be quite small, not over about 0.5 % of 0.05 N solution, if the reagents are prepared as described.

After the completion of the titration the burette is withdrawn, the receiver drained and washed twice with water. The air stream is turned off and the distillation flask again connected to the steam trap and the water in the steam generator boiled. Removal of the burner while squirting water into the receiver empties and washes the entire apparatus. This operation should be repeated once giving two washings, which are withdrawn from the bottom of the trap. The apparatus is then ready for the next determination.

Results.

The detailed method given above is the final result of much experimentation on various technical aspects of the determination. The distillation of the ammonia from an ammonium sulfate solution of known concentration was relatively simple as soon as the necessity of addition of alcohol was appreciated. The data are given in Table I.

The range of absolute amounts of nitrogen used was from 3.88 % to 15.52 %. The recovery and accuracy were satisfactory in spite of the fact that the necessity for certain precautions were not then realized.

The development of the digestion method was then attempted using solutions of pure organic compounds so that the recovery could be adequately checked. It was here found that in dealing with such minute amounts of nitrogen, nothing must be left to chance. All reagents were correspondingly rendered as free as possible from

TABLE I.
Recovery of Ammonia from Ammonium Sulfate Solutions.

λ	Sample M	Ammonia found ε	Ammonia calculated ε	Error per cent
27,71	0,0100	0,5452	0,5542 (7,76 γ N)	— 1,8
		0,5527		— 0,3
		0,5607		+ 1,2
		0,5522		— 0,4
		0,5542		—
		0,5596		+ 0,9
55,42		1,1230	1,1084 (15,52 γ N)	+ 1,3
		1,1070		— 0,1
		1,1000		— 0,8
		1,0990		— 0,9
27,71	0,0050	0,2721	0,2771 (3,88 γ N)	— 1,8
		0,2774		+ 0,1
		0,2811		+ 1,4
		0,2721		— 1,8

ammonia and organic nitrogen and the amounts used were henceforth carefully controlled so that the blank would be constant. The data on pure compounds are given in Table II.

The compounds reported in Table II include only one which contained the benzene ring, viz. p-amino benzoic acid. This was found to be the only one requiring the use of hydrogen peroxide to clarify the digest. On the assumption that the Superoxol used did not contain nitrogen, this material was at first used *ad libitum*. A series of high and variable values resulted. It was found that diluting Superoxol with two parts of water and adding about 15 λ from a capillary pipette did not alter the blank and resulted in the acceptable values reported.

In the digestion of blood filtrates it was not found necessary to use hydrogen peroxide though its addition as described did not alter the values obtained. The data on filtrates of human blood are reported in Table III. The FOLIN-WU⁸ method of deproteinization was used. The smallest samples used for analysis corresponded to the non-protein nitrogen in 0,01 ml. of whole blood. In about half of the data reported Superoxol was used, and in the other half it was not. The chief difficulty encountered in the digestion of blood filtrate was in freeing it from the rather large amount

⁸ O. FOLIN and H. WU, Journ. Biol. Chem., 38, 90 (1919).

TABLE II.
Analysis of Pure Compounds.

Substance	Sample		Nitrogen calculated	Nitrogen found	Error		
	λ	M	γ	γ	per cent		
Urea	27,71	0,0056	4,34	4,20	— 3.2		
				4,31	— 0.6		
				4,38	+ 0.9		
				4,38	+ 0.9		
				4,32	— 0.3		
				4,29	— 0.9		
				4,34	—		
				55,42	8,68	8,68	—
				8,65	— 0.3		
				8,65	— 0.3		
Glutamic Acid . .	27,71	0,0155	6,01	6,06	+ 0.8		
				6,14	+ 2.0		
				6,06	+ 0.8		
				6,14	+ 2.0		
				6,01	—		
p-Amino Benzoic Acid		0,0216	8,36	8,31	— 0.5		
				8,35	— 0.1		
				8,50	+ 1.7		
				8,36	—		
				0,0203	7,87	7,89	+ 0.2
		0,0203	7,87	7,93	+ 0.8		
				8,02	+ 1.9		
				7,93	+ 0.8		
				7,73	— 1.7		
				7,77	— 1.2		

of water present without bumping. This was accomplished by placing the burner well to one side at first and very cautiously advancing it as the water was steamed off. finally applying the full heat of the glass burner to complete the digestion. In spite of this difficulty, complete analyses could easily be made in an average of 45 minutes.

The second sample of blood reported in Table III had an original volume of 0,1 ml. and was deproteinized by the technique to be described in paper IV of this series. Enough filtrate was obtained from this amount for at least eight determinations of non-protein nitrogen using the size of sample recorded. though not all these were run.

TABLE III.
Analysis of Protein-free Blood Filtrates⁹.

Sample λ	Nitrogen found γ	Nitrogen found Original blood mg. per cent	Deviation from mean per cent
1. Human blood — FOLIN-WU filtrate 1 : 10 dilution.			
203,5	8,45	41,5	+ 1,4
	8,34	41,0	+ 0,2
	8,30	40,8	— 0,3
	8,14	40,0	— 2,2
99,8	4,15	41,5	+ 1,4
	4,12	41,3	+ 0,9
	3,99	40,0	— 2,2
	4,06	40,7	— 0,5
	4,03	40,4	— 1,2
	4,19	42,0	+ 2,6
	Mean	40,92	
2. Human blood — FOLIN-WU filtrate 1 : 11,4 dilution ¹⁰ .			
99,8	3,57	40,7	+ 0,5
	3,61	41,2	+ 1,7
	3,60	41,0	+ 1,4
99,8 + 3,88 γ added nitrogen	7,36	39,7	— 2,0
	7,39	40,0	— 1,1
	Mean	40,52	

The accuracy and time consumed in using this method both compare well with the clinical non-protein nitrogen determination and even with the standard micro-Kjeldahl procedure.

Summary.

A method for analysis of nitrogen containing solutions by means of a drop-scale Kjeldahl method is described. The amounts of nitrogen in the samples reported varied from 3,88 λ to 15,52 λ .

The method described is essentially a standard Kjeldahl in principle, differing chiefly in the size of apparatus and the special technique necessary in dealing with minute volumes.

The mean error was about 1 per cent, the maximum error about 3 per cent.

⁹ Nitrogen found in original blood represents non-protein nitrogen.

¹⁰ Filtrate made from 0,1 ml. of blood. See paper IV of this series.

QUANTITATIVE DROP ANALYSIS.

IV. THE DETERMINATION OF UREA AND AMMONIA¹.

By

GORDON E. GIBBS and PAUL L. KIRK.

From the Division of Biochemistry, University of California Medical School,
Berkeley.

(Eingelangt am 9. Juli 1934.)

Determination of the fractions of nitrogen is a necessary addition to the determination of total nitrogen in biochemical or physiological work. Urea and ammonia are the simplest of these fractions, and therefore the first to be studied in this investigation. The distillation method described in the preceding paper of this series for the determination of total nitrogen appeared to provide a suitable starting point for determination of these nitrogen fractions. It early became apparent that certain difficulties were present, at least in the urea determination, which had not appeared in the Kjeldahl determination. In the attempt to solve these, an adaption of the diffusion technique of E. J. CONWAY and A. BYRNE² to the scale here used, was developed. This was found to have certain technical advantages over distillation, and to be somewhat more dependable. In this paper will be reported principally the results of the diffusion technique. In the analysis of blood, it is frequently necessary to use a protein free filtrate, and in order to make these methods applicable to general use with amounts of blood of the order of a drop in volume, a procedure is here described for the deproteinization of such quantities of blood.

¹ Aided by a grant from the Research Board of the University of California.

² E. J. CONWAY, *Biochem. Journ.*, **27**, 419 (1933), *ibid.*, 430.

Experimental.

Reagents: For the urea determination the reagents consisted of the following:

1. Standard hydrochloric acid solution about 0.05 N. containing methyl red indicator.
2. Standard sodium hydroxide solution about 0.05 N.
3. Saturated potassium carbonate solution.
4. Urease preparation. This was made by washing 1 g. of Permutit (according to FOLIN) with 30 ml. of water acidified with 2 drops of glacial acetic acid, rinsing 4 or 5 times with distilled water, and stirring the washed material with 0.5 g. of Jackbean meal. To this paste was added 30 ml. of 30 per cent alcohol followed by stirring or shaking for 10 minutes, and finally centrifugation until the extract was nearly clear. Finally there was added 1 ml. of a buffer solution made from 9.6 g. of primary sodium phosphate and 17.9 g. of secondary sodium phosphate dissolved in 100 ml. of water. The urease preparation was made fresh every day.

For the ammonia determination, the reagents were as above with the exception that the urease preparation was omitted.

For deproteinization of blood, the reagents were those specified by O. FOLIN and H. WU³, as follows:

1. 10 per cent sodium tungstate solution.
2. 0.66 N sulfuric acid solution.

Apparatus: In those cases where the distillation procedure was employed, the apparatus was identical with that described in the preceding paper.



Figure 1. Cross section of diffusion cell. $\frac{1}{2}$ natural size.

For use in the diffusion technique mentioned above, a diffusion cell was constructed. The cross section of such a cell is shown in Figure 1. It was readily constructed from glass tubing of about

³ J. Biol. Chem., 38, 90 (1919).

32 mm. outside diameter by making on the end a test-tube bottom, sucking this in, and with the use of a fine flame, blowing a central cup. Following the glass blowing operations the tube was cut and ground on the top so as to be readily sealed with a small flat glass plate. The entire operation was completed in from 15 minutes to one half hour. A good stopcock lubricant or a mixture of vaseline and paraffin in the ratio of 3 to 1 was used for sealing the glass plate.

In addition to the diffusion cell, capillary burette, and suitable pipettes for measurement of sample and reagents, a magnetic glass thread stirrer was almost necessary and an adjustable titration table desirable. These have been described by P. L. KIRK⁴.

For deproteinization of blood only one additional piece of apparatus was necessary. This was a special capillary centrifuge tube having a volume of 0.2 to 2.0 ml. The volume should be about 10 times the volume of the initial amount of blood being deproteinized. The tube was constructed from a piece of 2 mm. capillary tubing whose bore was swelled over a short area, below which the tube was pulled off to a taper. The desired volume of water or mercury could be run in and the tube calibrated for content, the calibration mark being placed on the capillary above the enlargement. The top of the tube was conveniently flared somewhat for filling.

Procedure.

Diffusion method: The diffusion cells were necessarily freed of all contamination of an acid or basic nature. It was, however, desirable that they were just sufficiently greasy that drops would not spread freely on the surface. If cells that had been thoroughly cleaned in cleaning solution permitted too easy spreading of drops, a trace of vaseline would remedy the condition. The dishes were washed thoroughly with hot running water and rinsed with distilled water. The central cup had to be especially well washed to prevent traces of caustic remaining. This was conveniently done by separate washings from the wash bottle, sucking out the water each time with a tube. The cell was then completely dried since

⁴ Mikrochemie, **XIV**, 1 (1933).

this aided in preventing spreading of the drops. The top was greased with either a good stopcock lubricant or with the vaseline-paraffin mixture described. A drop (about 100 λ) of saturated potassium carbonate was placed in the outside chamber. The pipette was not completely emptied since this might cause spattering of the solution into the central cup. A carefully measured drop (25 to 50 λ) of standard acid was put in the central cup by means of a capillary pipette which was rinsed as usual. The sample containing urea or ammonia was measured into the outside chamber on the side opposite the drop of potassium carbonate. If urea was being determined, about 50 λ of urease solution was placed beside but not merging with the sample. The cell was then warmed in an incubator to 35 to 50° C. (usually 37° C.) and covered tightly with the glass plate sealed with the lubricant. The cell was then tapped to merge the urease and sample and incubated. For convenience the time of incubation adopted was 1 hour though this was undoubtedly excessive, the time in the standard method being about 20 minutes. Following this the cell was tilted and tapped causing the merging of the digest with the potassium carbonate solution. The mixture was run around the chamber until thoroughly mixed and the cell incubated 2 hours more during which time all the ammonia diffused over and was absorbed by the acid in the central cup.

In determining ammonia the technique was identical except that the urease digestion was omitted. In either case, following the diffusion and collection of the ammonia, the excess acid was titrated by placing the cell on an adjustable titration table, inserting a magnetic glass thread stirrer and burette tip and titrating while stirring, to the production of a canary yellow color, using the standard caustic solution in the burette. A wad of cotton or a piece of white paper placed under the cell aided in the titration by providing a white background.

Blank determination were performed replacing the urea solution with water and carrying out the entire procedure. The difference between the blank titration and that of the determination gave the amount of ammonia released. Turbidity of the urease was accompanied by a slightly higher blank.

Distillation method: For checking the applicability of the distillation technique to the determination of urea and ammonia, the procedure was similar to that in the Kjeldahl determination of total nitrogen. Urease digestions were performed in the Kjeldahl digestion flask, using the same reagents as in the diffusion procedure. A drop of dilute sulfuric acid was hung in the neck of the flask which was then stoppered. This prevented any loss of ammonia during the digestion. The digest was transferred to the distillation flask, alkalized with saturated potassium carbonate solution, and distilled exactly as in the Kjeldahl procedure. Ammonia determinations were performed by direct addition of the sample to the distillation flask, with washing, alkalization with saturated potassium carbonate solution and distillation as before, after adding a few drops of alcohol.

Deproteinization of blood: The deproteinization method here described is an adaptation of the FOLIN-WU³ method to the drop scale. There is no obvious reason for believing that the technique used was not applicable to other methods of deproteinization. In the usual method, the accurate dilution of the blood is achieved by careful measurement of the solutions and water. Since capillary pipettes had to be rinsed, and since it was difficult to construct them for an accurate predetermined volume, the dilution on this scale was accomplished by measurement into the accurately calibrated capillary centrifuge tube previously described. Thus the dilution was not exactly 1 to 10 but approximated this and was accurately known. In some cases the dilution approximated 1 to 5 rather than 1 to 10.

The blood was measured with rinsing into a capillary centrifuge tube of approximately 10 times the volume of the blood pipette used. More water was added until the volume was about 6 times that of the original blood. One volume of 10 per cent sodium tungstate solution was added and mixed with the magnetic glass thread stirrer which continued the stirring while 1 volume of 0.66 N sulfuric acid was added slowly from the pipette. If the tube was so set that the stirrer struck its sides, a vigorous swirling was produced which was very effective in obtaining thorough mixing. The tube was lowered with the stirrer still striking its sides, thus

knocking off any adherent liquid. The tube was then whirled in a hand centrifuge to displace any air column and force the liquid down from the walls. It was filled to volume with water and again vigorously stirred with the thread stirrer, after which it was thoroughly centrifuged. If the filtrate was to stand any time, it was withdrawn and stored separately. Otherwise it could be pipetted off directly for analysis.

Results.

Since the distillation procedure has been tested by use of pure ammonium sulfate solutions reported in the previous paper of this series, no repetition of those data is necessary here. The diffusion method on similar test gave data which were equally satisfactory

TABLE I.
Analysis of Pure Urea Solutions by the Diffusion Method.

λ	Sample M	Nitrogen calculated γ	Nitrogen found γ	Error per cent
56,27	0,00117	1,85	1,92	+ 3,5
			1,82	- 1,6
			1,88	+ 1,6
			1,91	+ 3,2
			1,82	- 1,6
			1,79	- 3,1
			1,88	+ 1,6
99,8		3,28	3,27	- 0,3
			3,28	-
			3,28	-
			3,21	- 2,3
			3,24	- 1,3
17,82	0,0056	2,79	2,84	+ 1,8
52,85			8,34	+ 0,8
			8,27	-
			8,25	- 0,2
			8,23	- 0,5
			8,22	- 0,6
			8,13	- 1,7
			8,33	+ 0,7
			8,23	- 0,5

and for reasons of brevity will be omitted. The more important question of analysis of pure urea solutions was checked by both methods. Table I gives the results of analysis of such solutions by the diffusion method. It is apparent that the analysis of pure solutions proceeds at least as well as in the standard clinical methods though the amounts of urea nitrogen were in various cases as low as 1,85 γ .

Results of urea analysis by the distillation method were in the main satisfactory. More than one half of the data were within 2 per cent of the correct value. There was, however, a considerable tendency to obtain erratic results and a decided trend toward incomplete recovery. This result was not difficult to understand since there were a number of disturbing factors present here which were absent in the Kjeldahl procedure. The heavy buffering of the digest,

TABLE II.

Urea Determination in Human Blood by the Diffusion Method.

Sample λ	Urea Nitrogen found γ	Urea Nitrogen of Whole Blood mg. per cent	Deviation from Mean per cent
Whole Human Blood			
17,82	3,17	17,8	+ 0,6
	3,14	17,6	— 0,6
	3,12	17,5	— 1,1
	3,14	17,6	— 0,6
	3,18	17,9	+ 1,1
17,82 + 2,79 γ added urea nitrogen	5,98	17,9	+ 1,1
	5,95	17,7	—
	5,98	17,9	+ 1,1
	5,96	17,8	+ 0,6
	Mean	17,7	

FOLIN-WU Filtrates of Human Blood

99,8 (1 : 11,6 dil'n.)	1,55	18,0	— 0,6
	1,58	18,4	+ 1,7
(1 : 6,39 dil'n.)	2,85	18,3	+ 1,1
	2,85	18,3	+ 1,1
(1 : 11,4 dil'n.)	1,55	17,7	— 2,2
	Mean	18,1	

the employment of a very weak base to set free the ammonia, and the presence of the proteinaceous urease in addition to any other impurity which might be extracted from the Jack bean meal, may all have been complicating factors. The net effect of this was that very slight differences in technique threw in errors of disproportionate magnitude. Since the diffusion method showed none of these difficulties, was somewhat simpler in technique and equipment, and could be made as rapid for a series of determinations by using a sufficient number of cells, it is to be recommended for the determination of urea. For these reasons the data on urea determination by distillation are not here recorded.

Table II shows the results obtained in the analysis of both protein free filtrates of human blood and of the whole blood by the diffusion method. The filtrates were all made by the micro deproteinization method described, using the same blood in all cases. The fact that different lots of filtrate are in agreement with each other justifies the drop scale deproteinization procedure. It is to be noted that the direct analysis of whole blood is more convenient and the success of this determination demonstrates another advantage of the diffusion method, viz. that it is practically the only suggested method which may dependably be so applied, as was also stated by CONWAY and BYRNE².

TABLE III.

Analysis of Urea in Human Urine⁵.

Sample	Urea Nitrogen found	Urinary Urea Nitrogen in Sample	Deviation from Mean
λ	γ	γ	per cent
17,82 (1 : 40 dil'n.)	3,92	3,92	+ 1,4
	3,88	3,88	+ 0,3
	3,86	3,86	- 0,2
17,82 (1 : 40 dil'n.)			
+ 1,74 γ urea nitrogen added	5,59	3,85	- 0,4
	5,64	3,90	+ 0,9
	5,53	3,79	- 1,9
		Mean	3,867

⁵ Urine was diluted to 40 times its volume due to the large quantities of urea present.

Corresponding results in the analysis of urea in human urine by the diffusion technique are reported in Table III. The results are equally satisfactory, though the advantages of drop scale analysis are here largely nullified due to the very high concentration of urea present in urine, necessitating a considerable dilution

TABLE IV.

Ammonia Determination in Human Urine by the Diffusion Method⁶.

	Urinary Ammonia		
Sample	Ammonia Nitrogen found	Nitrogen in Sample	Deviation from Mean
λ	γ	γ	per cent
Sample No. 1			
17,82	4,73	4,73	— 0,3
	4,79	4,79	+ 0,9
	4,80	4,80	+ 1,2
	4,75	4,75	+ 0,1
	4,79	4,79	+ 0,9
17,82 + 0,71 γ			
ammonia nitrogen added	5,42	4,71	— 0,7
	5,42	4,71	— 0,7
	5,42	4,71	— 0,7
	5,46	4,75	+ 0,1
17,82 + 1,77 γ			
ammonia nitrogen added	6,63	4,86	+ 2,2
	6,37	4,60	— 3,1
	Mean	4,745	
Sample No. 2			
17,82	4,85	4,85	— 0,9
	4,97	4,97	+ 1,5
	4,88	4,88	— 0,3
17,82 + 1,77 γ			
ammonia nitrogen added	6,68	4,91	+ 0,3
	6,68	4,91	+ 0,3
	6,65	4,88	— 0,3
	6,63	4,86	— 0,7
	Mean	4,894	

⁶ Urine was diluted with 1 volume of water before sampling to bring the ammonia content within the lower range of the method.

to bring the value in the usual range of this method. For precise results the ammonia must be separately determined and subtracted since the direct determination gives the sum of urea and ammonia. The correction is quite small due to the great discrepancy in amounts of these constituents.

Human urine served for the study of ammonia determination since only in urine is the amount of ammonia appreciable. The results of analysis for ammonia by the diffusion method are reported in Table IV. The values are certainly preferable to those obtained by many of the clinical procedures, both with regard to simplicity and accuracy.

Table V shows the comparison of diffusion and distillation data

TABLE V.
Urinary Ammonia Determinations. Comparison of Methods.
Sample taken — 17,82 λ

Ammonia Nitrogen found	Deviation from Mean	Ammonia Nitrogen found	Deviation from Mean
Diffusion Method	per cent	Distillation Method	per cent
γ		γ	
Sample No. 1 (Diluted 1 : 1)			
3,50	— 1,1	3,56	+ 0,5
3,50	— 1,1	3,57	+ 0,9
3,59	+ 1,4	3,58	+ 1,1
3,51	— 0,9		
Mean			3,54
Sample No. 2			
6,40	+ 0,3	6,33	— 0,8
6,32	— 0,9	6,57	+ 3,0
6,43	+ 0,8	6,31	— 1,0
6,37	— 0,2	6,33	— 0,8
		6,39	+ 0,2
Mean			6,38

on the ammonia content of human urine. It demonstrates adequately that either method is applicable to this determination, though here as in the case of urea, the technique of the diffusion method is somewhat simpler. In many investigations which do not involve

the determination of urea but only of total and ammonia nitrogen, the distillation technique alone would undoubtedly serve adequately.

It should be emphasized that the diffusion method as here developed is not applicable to the determination of total nitrogen. Digestions cannot be run in diffusion cells such as are described, and transfer of the digest involves a dilution which cannot be accommodated in this apparatus. This does not mean that a diffusion method for total nitrogen cannot be developed.

K. LINDERSTRÖM-LANG and H. HOLTER⁷ have published a method for ammonia and urea determination, the range of which is approximately the same as that reported here. The apparatus used by these investigators was markedly more expensive and difficult to construct than that used in this investigation, and in general, the technique was more elaborate without being essentially more accurate. It is of interest that they likewise used a diffusion method.

In comparison with the method of CONWAY and BYRNE² the method here reported is applicable to considerably smaller quantities and the apparatus is easily constructed rather than requiring factory facilities for its production. A further advantage is that all opening of the cell during the determination is avoided, so that no possibility of loss of ammonia exists. It cannot be too strongly emphasized that in dealing with small quantities of material it is decidedly preferable to use minute accurately measured volumes of relatively concentrated reagents rather than larger volumes of highly dilute reagents such as were employed by the investigators mentioned in dealing with their smaller quantities. Only in this way may titrations be made sensitive and accurate. The equipment used in this investigation involved largely that which is used in the more general project whose aim it is to develop quantitative drop scale methods for all the constituents for which analyses are commonly run.

Summary.

Methods are described whereby amounts of ammonia and urea nitrogen of from 1.55 to 8.27 γ have been determined in pure solution, blood, and urine.

⁷ Ztschr. physiol. Chem., 220, 5 (1933).

The mean error involved in these methods approximated 1 per cent, the maximum error being about 3 per cent.

The apparatus and technique described were of a simple nature, readily adapted to ordinary laboratory conditions, and, to a considerable extent, were those already developed in connection with the general application of quantitative drop scale methods to all types of analytical technique.

KRISTALLFÄLLUNGEN DURCH AUSSALZUNG.

Von

L. ROSENTHALER.

Bern.

(Eingelangt am 17. Juli 1934.)

In der pharmazeutischen Analyse tritt das Problem auf, einfache Lösungen, wie etwa den Inhalt einer Ampulle, auf möglichst einfache Weise darauf zu prüfen, ob die Zusammensetzung mit der Inhaltsangabe übereinstimmt. Dazu eignet sich in vielen Fällen — mit den sich aus den Einzelheiten ergebenden Einschränkungen — die Kristallfällung durch Aussalzung. Sie kann über den qualitativen Nachweis hinaus noch zu rohen quantitativen Bestimmungen verwendet werden, indem man die Grenzkonzentration (Gr.-K.) bestimmt, in der noch Fällung eintritt.

Die Ausführung erfolgt in der Regel so, daß man einen Tropfen der Lösung auf dem Objektträger mit soviel Salz versetzt, daß ein wenig ungelöst bleibt¹. Nach Zusatz des Salzes legt man sogleich ein Deckglas auf, um Verdunstung nach Möglichkeit zu vermeiden.

Als Salze wurden zu dieser Untersuchung die Chloride, Nitrate und Sulfate des Ammoniums, Kaliums und Natriums verwendet.

Es seien zunächst die Beobachtungen mitgeteilt, die mit Alkaloidsalzen und einigen basischen Stoffen gemacht wurden. Von den nicht in der Tabelle aufgeführten Stoffen gaben in 1%iger Lösung Atropinsulfat und Hexamethylenetetramin keine Fällung, Antipyrin nur mit Ammonsulfat Tröpfchen; Emetinhydrochlorid gab in derselben Konzentration amorphe Fällungen mit den angewandten Salzen, mit Ausnahme von Kalium- und Natriumsulfat, mit denen keine Fällung eintrat.

¹ Manchmal tritt die Kristallbildung besser bei Verwendung von weniger Salz ein, auch mag es sein, daß manche von mir amorph beobachtete Fällungen unter günstigen Bedingungen kristallinisch werden.

	Ammonsulfat	Kaliumsulfat	Natriumsulfat	Ammonchlorid
Akonitinnitrat	Prismen. Stäbe, Spieße. Gr. K. zwischen 1:1000 und 1:1500	—	—	—
Alypinhydrochlorid	—	—	—	—
Apomorphinhydrochlorid	Sphärokristallinische, zuletzt z. T. drusige Gebilde. Gr. K. (für die amorphe Fällung) zwischen 1:1000 und 1:1500	Sphärokristallinische Gebilde. Übergang in Drusen nicht beobachtet. Gr. K. zwischen 1:200 und 1:300	Wie mit Kaliumsulfat. Gr. K. zwischen 1:500 und 1:750	Stabartige Gebilde und Prismen. In Lösung 1:2000 noch vereinzelt Stäbchen
Berberinhydrochlorid	Nadelchen, bei stärkerer Verdünnung neben amorphen Teilchen, die von 1:2000 an überwiegen. Gr. K. zwischen 1:4000 und 1:5000	Nadelchen. Gr. K. zwischen 1:200 und 1:500	Nadelchen. Gr. K. zwischen 1:200 und 1:500	Nadeln. Noch in Lösung 1:10.000
Bruzinsulfat	Stäbe und sechseckige schlanke Täfelchen. Gr. K. zwischen 1:5000 und 1:7500	Wie mit Ammonsulfat. Gr. K. zwischen 1:100 u. 1:200	Vorwiegend schmale Stäbchen. Gr. K. zwischen 1:750 und 1:1000	Stäbchen und Täfelchen mit spitzen oder dachförmigen Endflächen. Gr. K. zwischen 1:100 u. 1:200
Chinidinsulfat	Büschel von Nadeln. Gr. K. zwischen 1:1500 und 1:2000	Wie mit Ammonsulfat. Gr. K. zwischen 1:200 u. 1:500	Wie mit Ammonsulfat. Gr. K. zwischen 1:750 u. 1:1000	Wie mit Ammonsulfat. Gr. K. zwischen 1:750 u. 1:1000
Chininsulfat	Büschel feiner Nadeln. Gr. K. zwischen 1:3000 und 1:4000	Wie mit Ammonsulfat. Gr. K. zwischen 1:1000 und 1:1500	Wie mit Ammonsulfat. Gr. K. zwischen 1:3000 und 1:4000	Büschel schmalere Stäbe. Gr. K. zwisch. 1:500 (amorph) und 1:750

Kaliumchlorid	Natriumchlorid	Ammonnitrat	Kaliumnitrat	Natriumnitrat
—	Amorph. Gr. K. zwischen 1:200 und 1:300	Kleine Drusen, gekreuzte Stäbchen, trigonale Prismen. Gr. K. zwischen 1:750 und 1:1000	Meisttrigonale Prismen oder kleine Stäbe. Gr. K. zwischen 1:200 u. 1:300	Prismen, Stäbe, flache Tafeln, z. T. in Büscheln, H- und scherenartige Gebilde, oft in Rosetten. Gr. K. zwischen 1:750 (kleine Prismen) u. 1:1000
—	Prismen z. T. mit endständiger Pyramide, Sargdeckel, rhomboederartige Kristalle u. a. Gr. K. zwischen 1:100 und 1:200	Lange, schmale Stäbe, isoliert und in Büscheln. Gr. K. zwischen 1:100 u. 1:200	—	Schmale Stäbe und breitere Tafeln, vielfach in Büscheln. Gr. K. zwischen 1:750 und 1:1000
Wie Ammonchlorid. Gr. K. bei etwa 1:2500	Wie Ammonchlorid. In Lösung 1:4000 noch vereinzelte Stäbchen	Stabartige Gebilde und Prismen. In Lösung 1:1500 noch vereinzelte Stäbchen	Kristalle und Gr. K. wie Ammonnitrat	Wie Ammonnitrat. Einzelne Stäbchen noch in Lösung 1:7000
Nadeln. Noch in Lösung 1:2500	Nadeln. Noch in Lösung 1:8000	Nadeln. Gr. K. zwischen 1:5000 und 1:6000	Nadeln. Noch in Lösung 1:10.000	Nadeln. Von 1:3000 an vorwiegend amorph. Gr. K. zwischen 1:5000 und 1:6000
Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:200 u. 1:300	Stäbchen und Täfelchen. Gr. K. zwischen 1:500 u. 1:1000	—	Vorwiegend einfache schmale Prismen. Gr. K. zwischen 1:200 und 1:250	Zweidrig zugespitzte, zum Teil magnetnadelartige Gebilde. Gr. K. zwischen 1:100 u. 1:200
Wie mit Ammonsulfat. Gr. K. zwischen 1:2000 und 1:2500	Wie mit Ammonsulfat. Gr. K. zwischen 1:2500 und 1:3000	Amorph. Gr. K. zwischen 1:500 u. 1:750	Amorph. Gr. K. zwischen 1:750 u. 1:1000	Amorph. Gr. K. zwischen 1:2000 u. 1:2500
Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:1000 (amorph) u. 1:1500	Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:1000 und 1:1500	Amorph. Gr. K. zwischen 1:300 u. 1:400	Amorph. Gr. K. zwischen 1:500 u. 1:750	Amorph. Gr. K. zwischen 1:1000 und 1:1500

	Ammonsulfat	Kaliumsulfat	Natriumsulfat	Ammonchlorid
Cinchonidinsulfat	Gewirr von Nadeln. Gr. K. zwischen 1:1500 und 1:2000	Wie mit Ammonsul- fat. Gr. K. zwischen 1:200 und 1:500	Wie mit Ammonsul- fat. Gr. K. zwischen 1:750 und 1:1000	Nadeln, meist in Büscheln. Gr. K. zwi- schen 1:200 u. 1:500
Cinchoninsulfat	Stäbe und Nadeln teils isoliert, teils in Büscheln. Gr. K. zwischen 1:1000 und 1:1500	Vereinzelte derbe Prismen. Gr. K. zwi- schen 1:100 u. 1:200	Neben Stäbchen derbe Prismen. Gr. K. zwischen 1:200 und 1:300	Büschel von Nadeln u. Stäbchen. Gr. K. zwischen 1:300 und 1:500
Codeinphosphat	Nadeln zum Teil in Büscheln. Gr. K. zwi- schen 1:500 u. 1:750	—	—	—
Coffein	Feine Nadeln. Gr. K. etwa 1:5000	—	Feine Nadeln. Gr. K. zwischen 1:300 und 1:400	—
Coffein-Natrium- benzoat	Feine Nadeln. Gr. K. zwischen 1:1000 und 1:1500	—	—	—
Diocainhydro- chlorid	Mehreckige Täfel- chen, zum Teil mit unregelmäßigem Rand, oft viereckig und dann oben und unten eingekerbt. Gr. K. zwischen 1:3000 (amorph) u. 1:4000	—	Wie mit Ammonsul- fat. Gr. K. zwischen 1:500 und 1:1000	Büschel aus Stäben und schmalen, lan- gen, unregelmäßig- en Tafeln. Gr. K. zwischen 1:1500 und 1:2000
Eucaïn A (Hydrochlorid)	Tröpfchen. Gr. K. zwischen 1:500 (Körnchen) u. 1:750	—	—	Rosetten a. kleinen Stäben u. Spießen, die teilweise zu mehreckigen Tafeln auswachsen. Gr. K. zwischen 1:300 und 1:500
Eucaïn B (Hydrochlorid)	Zum Teil Rosetten aus Prismen und Stäben, z.T. unregel- mäßig begrenzte Einzelkristalle. Gr. K. zwischen 1:750 und 1:1000	—	—	Derbe Prismen, z.T. in Rosetten und un- regelmäßig be- grenzte Einzel- kristalle. Gr. K. zwi- schen 1:100 u. 1:200

Kaliumchlorid	Natriumchlorid	Ammonnitrat	Kaliumnitrat	Natriumnitrat
Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:500 u. 1:750	Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:1000 u. 1:1500	Prismen u. Büschel von Stäben. Gr. K. zwischen 1:200 und 1:500	Amorph. Gr. K. zwischen 1:200 u. 1:500	Amorph. Gr. K. zwischen 1:750 u. 1:1000
Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:1000 und 1:1500	Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:1000 und 1:1500	Prismen u. Büschel von Stäben. Gr. K. zwischen 1:200 und 1:300	Amorph. Gr. K. zwischen 1:200 u. 1:300	Amorph. Gr. K. zwischen 1:1000 und 1:1500
Stäbe. Gr. K. zwischen 1:100 u. 1:200	Rosetten u. Büschel aus Stäben. Gr. K. zwischen 1:100 und 1:200	—	—	Nadeln, zum Teil in Büscheln. Gr. K. zwischen 1:100 u. 1:200
—	Feine und derbe Nadeln. Gr. K. zwischen 1:100 u. 1:200	—	—	—
—	—	—	—	—
Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:1500 und 1:2000	Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:3000 (amorph) u. 1:4000	Amorph. Gr. K. zwischen 1:2000 und 1:3000	Amorph. Gr. K. zwischen 1:2000 und 1:3000	Amorph. Gr. K. zwischen 1:2000 und 1:3000
Kleine Rosetten u. viereckige Tafeln. Gr. K. zwischen 1:300 und 1:500	Mehreckige Tafeln und Rosetten aus solchen u. Spießen. Gr. K. zwischen 1:750 und 1:1000	Rosetten aus blattartigen Gebilden, Aggregate aus parallelen Tafeln, Büschel von Stäben. Gr. K. zwischen 1:500 und 1:750	Schmale Stäbchen od. breitere Tafeln und Rosetten aus solchen. Gr. K. zwischen 1:300 u. 1:500	Büschel langer Nadeln und schmale Tafeln in paralleler oder verzweigter Anordnung. Gr. K. zwischen 1:1500 (Stäbchen) u. 1:2000
Ähnlich wie mit Ammonchlorid. Daneben blattartige Gebilde, zum Teil in Rosetten. Gr. K. zwischen 1:400 und 1:500	Derbe Prismen und Tafeln. Gr. K. zwischen 1:3000 (Einzelkriställchen und Drusen) und 1:4000	Amorph. Gr. K. zwischen 1:100 u. 1:200	Amorph. Gr. K. zwischen 1:100 u. 1:200	Amorph. Gr. K. zwischen 1:500 u. 1:750

	Ammonsulfat	Kaliumsulfat	Natriumsulfat	Ammonchlorid
Larocain (Hydrochlorid)	Amorph. Gr. K. zwischen 1:250 u. 1:500	—	—	—
Morphinhydrochlorid	—	—	—	—
Novocain (Hydrochlorid)	Amorph.	—	—	—
Panthesin	Sehr langsam Rosetten aus mehr-eckigen Tafeln und blattförmigen Gebilden. Gr. K. zwischen 1:1000 (amorph) und 1:1500	Amorph, Gr. K. zwischen 1:100 u. 1:200	—	—
Psicain, neu (Hydrochlorid)	Amorph Gr. K. zwischen 1:500 u. 1:1000	—	—	Büschel schmaler Stäbe. Gr. K. zwischen 1:500 u. 1:1000
Pyramidon	Nadeln zum Teil verzweigt oder Tafeln verschiedener Art. Gr. K. zwischen 1:1000 und 1:1500	—	Hauptsächlich viereckige Täfelchen. Gr. K. zwischen 1:200 und 1:250	—
Stovain (Hydrochlorid)	—	—	—	—
Strychninhydrochlorid	Sehr feine Stäbchen, teils isoliert, teils in Büscheln. Gr. K. zwischen 1:1500 und 1:2000	—	Neben Stäben und schmalen Tafeln, z. Teil mit schiefen Endflächen, derbe Prismen. Gr. K. zwischen 1:200 u. 1:400	Nadeln und schmale Stäbe. Gr. K. zwischen 1:500 u. 1:1000

Kaliumchlorid	Natriumchlorid	Ammonnitrat	Kaliumnitrat	Natriumnitrat
—	Derbe Stäbe, Tafeln und Prismen. Gr. K. zwischen 1:250 und 1:500	Unregelmäßig begrenzte, vielfach eingekerbte Tafeln. Gr.K.zwischen 1:100 und 1:200	—	Amorph. Gr.K. zwischen 1:250 u. 1:500
—	Nadeln u. Stäbchen, z. Teil in Büscheln. Gr. K. zwischen 1:200 und 1:300	—	—	Wie mit Natriumchlorid. Gr. K. zwischen 1:200 u. 1:300
—	Rauten u. a. mehr-eckige Tafeln. Gr. K. zwischen 1:100 und 1:200	—	—	Amorph
Vorzugsweise dreieckige Tafeln, oft in Rosetten, auch hutförmige Gebilde. Gr. K. zwischen 1:200 und 1:300	Außer Tafeln wie mit Kaliumchlorid unregelmäßige Prismen u. drachenartige Gebilde. Gr. K. zwischen 1:750 und 1:1000	Rosetten aus gekerbten Tafeln und blattartigen Gebilden. Gr. K. zwischen 1:300 und 1:500	Wie mit Ammonnitrat. Gr. K. zwischen 1:200 und 1:300	Wie mit Ammonnitrat. Gr. K. zwischen 1:1000 und 1:1500
Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:500 und 1:1000	Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:1500 (Stäbchen) und 1:2000	Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:500 und 1:1000	Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:500 u. 1:1000	Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:2500 (Stäbchen) und 1:3000
Hauptsächlich viereckige Tafeln und Stäbchen. Gr. K. zwischen 1:200 u. 1:250	Wie mit Kaliumchlorid. Gr. K. zwischen 1:250 u. 1:500	—	—	Wie mit Kaliumchlorid. Gr. K. zwischen 1:250 u. 1:500
—	Schmale Prismen, vielfach gekreuzt, Gr. K. zwischen 1:100 und 1:200	—	—	Amorph. Gr. K. zwischen 1:200 u. 1:300
Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:1000 u. 1:2000	Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:1000 u. 1:2000	Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:200 u. 1:400	Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:200 u. 1:400	Wie mit Ammonchlorid. Gr. K. zwischen 1:500 u. 1:1000

Was die theoretische Seite der mitgeteilten Beobachtungen betrifft, so sei zunächst nur auf folgendes aufmerksam gemacht: Wenn auch der Titel dieser Arbeit der Einfachheit halber „Kristallfällungen durch Aussalzung“ lautet, so soll damit nicht gesagt sein, daß es sich in allen Fällen um eine einfache Aussalzung handelt, daß also der ausgefallene Stoff mit dem ursprünglich in Lösung gewesenen identisch ist. Der ausgefallene Stoff kann auch durch doppelte Umsetzung entstanden sein, falls gelöster Stoff und Salz verschiedene Ionen besitzen. Ferner ist mit Doppelsalzbildung und mit Unterschieden in einem Gehalt an Kristallwasser zu rechnen. Erst wenn diese Vorfragen entschieden sind, kann ermittelt werden, ob auch mit „spezifischen“ Wirkungen der Fällungsmittel zu rechnen ist.

Über das Verhalten der angewandten Salze gegenüber nicht-basischen Stoffen und Mischungen soll später berichtet werden.

CONTRIBUTIONS TO THE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY OF CHOLESTEROL.

A. TECHNIQUE OF THE MIKROANALYSIS OF CHOLESTEROL.

I. COMMUNICATION:

Contribution to the reactional kinetic of the Liebermann-Burchardt reaction and new basis to the correct reading of such reaction in the colorimetry of cholesterol.

By

KAREL ŠILINK.

From the Clinic of Internal Diseases of Professor J. PELNÁŘ in Prague. Endocrinological group of Professor J. CHARVÁT.

(Eingelangt am 12. Juli 1934.)

The importance of cholesterol in the organism has, up to the present, been insufficiently explained, in spite of the fact that hundreds of research-workers have concentrated on the solution of this question during the last twenty years. One can well understand the interest taken in this compound, since it appears in the organism in a relatively important and constant quantity, especially in the suprarenal glands, the brain, the liver and the spleen. There is more of it in the blood than of the extremely biologically important glucose (0,17%). The level of cholesterol in the blood often suffers change, and therefore connections have been sought between the contents of cholesterol in the blood and the conditions of the organism, though in spite of considerable efforts dedicated to this research, one has not definitely succeeded up to now to define these connections exactly. In many cases these results are contradictory, though they were obtained by the same technique.

The difficulties with cholesterol are not only in the physiological and biochemical sphere, they have also their parallel in the chemi-

cal research of that substance, which have been made for over one hundred years, and culminated in the systematical research work of Windaus and his school which, lasting over a number of years, is also reaching its conclusions. The cause of the slight success in the solution of the physiological qualities of cholesterol lies chiefly in the relatively slight reactivity of that substance and the analytical difficulties arising from the same. We lack exact methods that we might apply to a more detailed research of the metabolism of cholesterol, which is necessary to undertake by a series of analyses of the same object i. e. with cholesterolaemic curves under various conditions. Series-analysis may be undertaken repeatedly only by microanalysis, since it is impossible to take a large quantity of blood often. Thereby we should also change the experimental conditions, and even in animals this analysis would not be reliable.

The most exact chemical method, gravimetry — used for the first time for the detection of cholesterol in the blood by Fex — demanded a considerable amount of material (10—20 ccm of serum) and was compensated by a number of micromodifications. However even this was insufficient for the series-analyses, since the requisite quantities of serum are also great. On the whole this is the same for titrimetry used for the detection of cholesterol in the blood by BANG¹ and developed by BLOOR², OKEY³ and TURNER⁴. Moreover gravimetical and titrimetical methods are relatively difficult, so that even these are not proper for series-analysis.

Of metrical principles for the detection of cholesterol, the most widespread is colorimetry. It is relatively easy and sensitive and detects cholesterol from a small quantity of material, but its great disadvantage is considerable inexactitude. All methods for detecting cholesterol based on the most varied principles suffer a common fault: none of them succeeds in detecting a total of cholesterol since, as a result of incomplete extraction from the biological material, a part always escapes detection. Furthermore every method has its special faults: gravimetry in preparation and washing

¹ BANG, *Biochem. Ztschr.*, **91**, 86 (1918).

² BLOOR, *Journ. Biol. Chem.*, **77**, 53 (1928).

³ OKEY, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **26**, 518 (1929).

⁴ TURNER, *Journ. Biol. Chem.*, **92**, 495 (1931).

the product of cholesterol with digitonin, titrimetry in the incomplete oxydation of cholesterol, though mostly they are systematical faults, whereas in colorimetry, especially of cholesterol, the possibility of nonsystematical faults is greatest. The subjective side also comes into play in the reading, though the main sources of faults lie in the technique, for with such small quantities of determined material and such an exact procedure we do not always reach the same conditions for analysis. For cholesterinaemical curves colorimetry only is proper, owing to the small demand of material, though it is a question whether the single rate of the curves does not differ in the sphere of possible faults of this method. This may be regarded as the cause of the lack of knowledge of the function and biochemistry of cholesterol. Thus we are up against this methodical obstacle when Prof. CHARVÁT and myself decided to solve systematically the problems of the metabolism of cholesterol.

We considered that, before beginning the research, it would be necessary, first of all, to settle the delicate technical question. As the first point we chose the revision of colorimetrical methods and an attempt to apply them to the demands of exactitude.

Colorimetry is based on the principle that a definite quality and intensity of colouring of a proper volume corresponds to a given quantity of the material tested, and the quality and intensity of the colour should be an exact expression of concentration of the material tested. The ideal of the colorimetrical method is, that the colouring should depend only on the concentration and should not be determined by a series of other better or worse defining changes. Unfortunately, most of this seldom happens, since we lead the determined material to a reaction, the result of which is the colouring which we compare. Traces of various admixtures may disturb the process or the completeness of the reaction, so that the colouring need not correspond to the concentration for it depends also on the concentration of the remaining materials, where a slight technical blunder may cause an error. The most important colour-reactions of cholesterol are that of LIEBERMANN-BURCHARDT (a chloroform solution of cholesterol with anhydrid of acetic acid and concentrated sulphuric acid gives a green colouring) and that of SALKOWSKI (a chloroform solution of cholesterol

with concentrated sulphuric acid gives an orange colouring). Both have been used in colorimetry, but chiefly that of LIEBERMANN-BURCHARDT. The TSCHUGAEF reaction is less known (a solution of cholesterol in iced acetic acid with acetylchlorid an chlorid of zinc gives a pink colouring and, on being heated, a brown colouring). Further the MEESMACKER's, ROSENHEIM-CALOW's NEUBERG's and several other reactions. None of these reactions is specific for cholesterol, it is generally a question of reaction on sterols in general. Of our own experiments we quote three other colour reactions on cholesterol, the detailed description of which we shall leave for a some future communication:

1. A hot solution of cholesterol in iced acetic acid with several drops of concentrated sulphuric acid gives a red-violet colouring.

2. The solution of cholesterol in iced acetic acid with chlorid of tin at a rate of 5 : 1 gives a violet and, after heating, a yellow colouring.

3. Solution of cholesterol in chloroform with chlorid of tin gives, after heating, a yellow to orange colouring.

Further experiments will decide the best conditions of reactions and their specificity.

The LIEBERMANN-BURCHARDT reaction has been most used for colorimetry. It is sufficiently sensitive and does not depend so much on moisture as does the SALKOWSKI's reaction. According to the original rule of AUTENRIETH & FUNK two cubic centimetres of anhydrid of acetic acid and three drops of concentrated sulphuric acid are added to 5 ccm of chloroform solution of cholesterol. This mixture is placed in a water bath of 32—35° C in the dark for ten minutes. Later⁵ they recommended a temperature of 20—21° C, determined after 20 minutes, and sulphuric acid measured 0,1 ccm with a blow-pipe instead of drops. In this modification the LIEBERMANN-BURCHARDT reaction is used in most methods. The methods differ only in the manner of extracting cholesterol from the blood-serum and the transference to the chloroform solution.

The LIEBERMANN-BURCHARDT reaction, however, is of itself a considerable source of error in the colorimetry of cholesterol

⁵ AUTENRIETH-FUNK, Münch. med. Wochenschr., **23**, 1243 (1913); also: Quantitative Klinische Analysen mit dem Hellige Universal-Kolorimeter Autenrieth-Koenigsberger. F. Hellige & Co., Freiburg 1931, S. 15.

The maximum of intensity does not take place immediately, but rather the time of its appearance depends on temperature. But even at the same temperature a maximum does not take place in all reactions in the same time. At a temperature of 20° C the time of the appearance of the colour is 17-20 minutes. After having attained the maximum of intensity the colour again weakens and, therefore, if it has not reached the maximum during the determination, we obtain a lower value. MIRSKY & BRUGER⁶ call attention to the fact that only under the influence of an incorrect process of the LIEBERMANN-BURCHARDT reaction do errors occur during determination up to 15%. It is recommended to make the reaction at a temperature of 5° C. Conversely SAITO⁷ recommends a temperature of 30° C and reads off the intensity after 6—9 minutes. SCHUBBE⁸ makes the reaction but reads off the intensity after 24 hours, when the green colouring has turned to yellow. The author considers the yellow colouring a more exact expression of the concentration of cholesterol. The colouring, however, is less intensive and the determination of weak concentrations is more difficult, moreover the yellow colour of the blood extracts is disturbing (icterus).

Since the LIEBERMANN-BURCHARDT reaction is the primary source of error in the colorimetry of cholesterol, I have observed the dependence of the intensity on time in a series of experiments, besides certain circumstances acting upon the same.

I arranged my experiments as follows: in 8 flasks with glass-stoppers I measured 5 ccm of chloroform solution of cholesterol 8—10 mg %, I added to this 2 ccm of anhydrid of acetic acid and 0,1 ccm of concentrated sulphuric acid. After closing and shaking the flasks I placed them gradually in a water bath in the dark immediately after adding the sulphuric acid and shaking them. All these 8 flasks were thus prepared in the space of 5 minutes. 5 minutes later I placed the flasks with the water bath on a table in a dark place and took them for colorimetry in the same order in which I added the sulphuric acid. I compared them on AUTEN-

⁶ MIRSKI-BRUGER, Journ. Lab. a. Clin. Med., 18, 304 (1932).

⁷ SAITO, Journ. of orient. Med., 13, 58 (1930).

⁸ SCHUBBE, Journ. Lab. a. Clin. Med., 18, 306 (1932).

RIETH's colorimeter (HELLIGE) with a lamp with a ruby filter. After a quick reading I returned the contents of the cuvette of colorimeter to the original flask. I read all 8 flasks in the course of 5 minutes and then began again with the first flask. I repeated this continually, usually until the intensity of the colouring began to diminish, or even after this. By this means I obtained 8 reactionary curves, demonstrating the increase of the colouring from the tenth minute beginning with intervals of 5 minutes. In the further series I observed the course of the curves after adding water and alcohol. I carried out the experiments in the same way as before.

I. series of experiments.

Curve No. 1—8. A pure solution of cholesterol in chloroform. 5 ccm containing 0,5 mg of cholesterol.

Temperature: 17° C.

Results: Table No. 1. Diag. No. I.

Summary: As is evident from the diagram No. I. the curve of colour intensity reaches its maximum in the majority of cases within 15—30 minutes. Then the colour disappears, namely at the same speed for all curves, whereas the appearance of the colour and the attainment of the maximum was rather irregular. Two curves however, attained the maximum much later, one in 35 minutes, the other not until 75 minutes. It is a question of retarded reaction. It is interesting, however, to note that the maximum of colouring in these retarded reactions is much less than in the majority of curves. Another interesting phenomenon is the circumstance that the later the maximum develops, the lower it is. The maximum in retarded reaction attains just that rate, at which for that time the intensity of normal reactions weakened.

II. series of experiments.

Curves No. 9—12 and 15—22. A pure solution of cholesterol in chloroform. 5 ccm containing 0,425 and 0,442 mg of cholesterol.

Temperature: 17° C.

Results: Table No. 2 and 4. Diag. No. II and III.

Summary: All reactions are completely normal. No retarded reactions. The decrease in the intensity of colouring is calculated on the percentage with regard to the results of the first series, it

takes place entirely in the same manner and the concentration of cholesterol has no marked influence on the course of reaction. From these reactions it is seen that the development of the maximum colouring is much quicker than the loss of colour. For information as to how the curves appear from the beginning I prepared two curves with a content of cholesterol 0,425 mg in 5 ccm at two minute intervals. Resultes: Curves No. 13 and 14. Table No. 3. Diag. No. IV. Temperature: 22° C.

From the experiments made it is clear that the development of the LIEBERMANN-BURCHARDT reaction has two stages:

I. The development of green colouring. This development begins slowly, increasing gradually in speed, but the speed decreases again

TABLE NO. 1.

Curves No. 1.—8.

A pure solution of cholesterol in chloroform (5 ccm containing 0,5 mg of cholesterol).

Temperature: 17° C.

Time	1		2		3		4		5		6		7		8	
	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%
10	25	83	19	89	24	78	64	38	29	78	20	88	50	54	34	72
15	19	89	11	99	22	85	58	45	18	91	16	92	40	66	24	85
20	20	89	11	99	15	94	50	54	13	96	12	98	28	79	15	94
25	15	94	10	100	15	94	43	62	10	100	12	98	25	83	14	95
30	17	92	13	96	14	95	41	64	11	99	17	92	23	85	18	91
35	23	85	21	87	20	88	40	66	17	92	21	87	21	87	18	91
40	—	—	—	—	—	—	38	67	20	88	23	85	25	83	20	88
45	—	—	—	—	—	—	36	70	21	87	27	80	26	81	23	85
50	—	—	—	—	—	—	37	69	—	—	—	—	—	—	—	—
55	—	—	—	—	—	—	35	71	—	—	—	—	—	—	—	—
60	30	77	30	77	30	77	34	72	27	80	30	77	30	77	28	79
65	—	—	—	—	—	—	35	71	—	—	—	—	—	—	—	—
70	—	—	—	—	—	—	37	69	—	—	—	—	—	—	—	—
75	—	—	—	—	—	—	34	72	—	—	—	—	—	—	—	—
80	—	—	—	—	—	—	33	74	—	—	—	—	—	—	—	—
85	—	—	—	—	—	—	33	74	—	—	—	—	—	—	—	—
90	37	69	37	69	37	69	35	71	36	70	37	69	38	68	37	69

K. indicates the number read direct on the scale of colorimeter. % indicates the percentage of the highest intensity of colouring attained.

Curves No. 4. and 7. express retarded reactions.

before attaining the maximum. After attaining the maximum the second stage begins:

11. The fading of the green colouring. This again begins slowly, gaining speed quickly, but the fading proceeds more and more slowly. The colour does not disappear completely, but turns to yellow. This, however, does not take place for a number of hours. In the cases observed two later reactions appeared. The causes of retardation are not known (moisture?) since only clean flasks and reagents were used. Retarded reactions are, however, characterised only by a retardation of the first stage — the development of the green colouring.

TABLE NO. 2.

Curves No. 9.—12.

A pure solution of cholesterol in chloroform (5 ccm containing 0.425 mg of cholesterol).

Temperature: 17° C.

Time	9		10		11		12	
	K	%	K	%	K	%	K	%
10	38	80	45	73	47	71	29	95
15	30	93	32	91	37	84	38	96
20	29	95	31	92	30	93	25	100
25	29	95	28	96	28	96	27	97
30	29	95	28	96	26	98	30	93
35	32	91	28	96	28	96	28	96
40	35	87	33	90	30	93	33	90

TABLE NO. 3.

Curves No. 13.—14.

A pure solution of cholesterol in chloroform (5 ccm containing 0.425 mg of cholesterol).

Temperature: 22° C.

Time	13		14		Time	13		14	
	K	%	K	%		K	%	K	%
2	98	2.5	96	5	16	26	96	23	100
4	85	12	73	35	18	26	96	24	99
6	62	48	46	70	20	26	96	25	98
8	36	83	35	84	22	28	94	26	96
10	29	92	28	94	24	29	92	28	94
12	25	97	26	95	30	32	88	31	89
14	24	99	26	96	40	35	84	37	82

The fading of the colour in these reaction proceeds at the same speed as in normal curves. One may judge from this, that it is a question here of two completely independent mechanisms, since if the fading were causally dependent on the development of the green colour it would also be slowed down. I. action — the development of the green colouring is probably much more sensitive under different disturbances. A further results of experiments is that in normal curves, if the action were read, as is usual, after the 20th minute, about 11% of error would arise. If we include retarded reactions in this, the error would exceed 40%. If we read, however, the maximum intensity of normal curves, the error is less than 5,5%. Including retarded reactions: 25%. But because the process of fading is regular also in retarded reactions, the possibility arises to determine the correct concentration of cholesterol by maximum calculation of 20—25 minutes, provided we know the retarded maximum and the time at which this happens. Or, if we know the curve of the process of fading, for this we find the maximum for any time.

In further series I tested the causes of retarded reactions. Above all I have established what influence the presence of water has in the reactionary mixture.

TABLE NO. 4.

Curves No. 15.—22.

A pure solution of cholesterol in chloroform (5 ccm containing 0,442 mg of cholesterol).

Temperature: 17° C.

Time	15		16		17		18		19		20		21		22	
	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%
10	58	52	52	60	42	72	36	80	57	54	42	72	49	64	37	79
15	40	75	38	77	28	90	30	87	43	82	30	87	38	77	24	95
20	29	89	30	87	28	90	27	91	36	80	28	90	30	87	20	100
25	28	90	29	89	24	95	27	91	28	90	24	95	21	99	23	96
30	23	96	28	90	23	96	27	91	27	91	24	95	28	90	22	98
35	24	95	26	93	23	96	27	91	25	94	25	94	30	87	22	98
40	24	95	26	93	29	89	30	87	32	85	29	89	30	87	22	98
45	25	94	29	89	29	89	33	84	29	89	33	84	31	86	24	95
50	28	90	30	87	32	85	37	79	30	87	36	80	36	80	27	91
55	35	82	37	79	38	77	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
100	42	72	42	72	44	70	48	65	44	70	40	75	46	68	42	72

III. series of experiments.

Curves No. 23-46: 5 ccm of chloroform solution of cholesterol.
The influence of water on the course of reaction.

Table No. 5, 6, 7. Diag. No. V and VI.

Curves No. 23, 24, 31, 32, 39, 40: no water was added for controlling the reaction.

Curves No. 25, 26: 0.002 ccm of water was added.

Curves No. 27, 28: 0.005 ccm of water was added.

Curves No. 29, 30: 0.010 ccm of water was added.

Curves No. 33, 34: 0.02 ccm of water was added.

Curves No. 35, 36: 0.04 ccm of water was added.

Curves No. 37, 38: 0.08 ccm of water was added.

TABLE NO. 5.

Curves No. 23.—30.

The influence of water on the course of reaction.

5 ccm of chloroform solution containing 0.44 mg of cholesterol.

Temperature: 16° C.

Curves No. 23, 24: no water was added for controlling the reaction.

Curves No. 25, 26: 0.002 ccm of water was added.

Curves No. 27, 28: 0.005 ccm of water was added.

Curves No. 29, 30: 0.01 ccm of water was added.

Time	23		24		25		26		27		28		29		30	
	K	°	K	°	K	°	K	°	K	°	K	°	K	°	K	°
10	75	32	51	63	48	66	60	51	74	46	62	49	87	17	64	46
15	44	72	30	90	39	78	40	77	57	55	55	58	66	44	59	52
20	32	87	25	96	34	85	36	82	50	64	54	59	54	59	55	57
25	26	95	22	100	30	90	29	91	44	72	50	64	47	69	48	66
30	25	96	22	100	24	98	26	95	37	81	40	77	40	77	43	73
35	27	94	—	—	27	94	26	95	37	81	37	81	38	80	35	84
40	27	94	—	—	26	95	27	94	34	85	37	81	—	—	—	—
45	26	95	25	96	25	96	27	94	35	84	34	85	33	86	33	86
50	—	—	—	—	26	95	27	94	33	86	35	84	—	—	—	—
55	—	—	—	—	27	94	28	92	33	86	34	85	—	—	—	—
60	—	—	—	—	29	91	30	90	38	80	38	80	—	—	—	—
65	31	89	32	87	30	90	32	87	38	80	38	80	34	85	37	81
75	35	84	37	81	—	—	—	—	—	—	—	—	41	76	38	80
80	—	—	—	—	34	85	—	—	38	80	—	—	—	—	—	—
100	—	—	—	—	39	78	—	—	42	75	—	—	—	—	—	—
105	41	76	43	73	—	—	—	—	—	—	—	—	47	68	42	75
135	47	68	46	70	44	72	—	—	47	68	—	—	—	—	—	—

Curves No. 41, 42: 0,16 ccm of water was added.

Curves No. 43, 44: Mixture without water, but with a double quantity of sulphuric acid (0,2 ccm).

Curves No. 45, 46: 0,08 ccm of water plus 0.2 ccm of sulphuric acid instead of 0,1 ccm.

Temperature: 16° C.

Summary: The presence of water, even in slight traces, retards the I. stage of the LIEBERMANN-BURCHARDT reaction. This is clearly seen after the addition of 0,005–0,02 ccm of water. II. stage — the fading of the solution — is not influenced by the presence of water.

TABLE NO. 6.

Curves No. 31.—38.

The influence of water on the course of reaction.

5 ccm of chloroform solution containing 0,44 mg of cholesterol.

Temperature: 16° C.

Curves No. 31, 32: no water was added for controlling the reaction.

Curves No. 33, 34: 0,02 ccm of water was added.

Curves No. 35, 36: 0,04 ccm of water was added.

Curves No. 37, 38: 0,08 ccm of water was added.

Time	31		32		33		34		35		36		37		38	
	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%
10	40	77	50	64	84	20	85	19	85	19	85	19	90	13	92	10
15	38	80	42	74	69	40	77	29	78	28	69	40	82	23	84	20
20	30	90	34	85	64	46	64	46	70	38	62	49	82	23	84	20
25	28	93	28	93	51	63	57	55	62	19	51	63	75	32	77	29
30	28	93	25	96	43	73	48	67	55	58	46	70	72	36	75	32
35	25	96	26	95	39	78	43	73	48	67	42	74	69	40	70	38
40	25	96	25	96	—	—	—	—	—	—	—	—	64	46	65	45
45	25	96	25	96	35	83	39	78	46	69	39	78	59	52	—	—
50	26	95	24	98	—	—	—	—	—	—	—	—	55	57	57	55
55	28	93	24	98	36	82	35	83	44	71	40	77	56	57	—	—
60	32	87	28	93	—	—	—	—	—	—	—	—	55	57	56	57
65	33	86	29	91	36	82	38	79	43	73	42	74	52	61	—	—
75	—	—	—	—	38	79	39	78	43	73	43	73	—	—	—	—
80	34	85	32	87	—	—	—	—	—	—	—	—	50	64	50	64
100	40	77	40	77	—	—	—	—	—	—	—	—	49	66	50	64
105	—	—	—	—	44	71	43	73	48	67	46	69	—	—	—	—
135	45	71	44	71	—	—	—	—	—	—	—	—	51	63	53	60

Since in BLOOR's method⁹ traces of water from an extract of alcohol-aether may enter the reactionary mixture, this affords an explanation of retarded reactions in determining cholesterol in serum or in the blood. The occurrence of retarded reactions in working the chloroform extracts according to the BLOOR is indeed much more frequent than in pure solutions. An excess of sulphuric acid causes a distinct acceleration of the I. stage of LIEBERMANN-BURCHARDT reaction, but also causes too great a maximum which does not correspond to the concentration. II. stage, i. e. the fading, is not influenced by an excess of sulphuric acid. The presence of

TABLE NO. 7.

Curves No. 39.—46.

The influence of water on the course of reaction.

5 ccm of chloroform solution containing 0,44 mg of cholesterol.

Temperature: 16° C.

Curves No. 39, 40: no water was added for controlling the reaction.

Curves No. 41, 42: 0,16 ccm of water was added.

Curves No. 43, 44: mixture without water, but with a double quantity of sulphuric acid (0,2 ccm).

Curves No. 45, 46: 0,08 ccm of water plus 0,2 ccm of sulphuric acid instead of 0,1 ccm.

Time	39		40		41		42		43		44		45		46	
	K	0/0	K	0/0	K	0/0	K	0/0	K	0/0	K	0/0	K	0/0	K	0/0
10	51	63	60	51	78	28	80	26	24	98	26	95	30	90	32	87
15	40	77	38	80	78	28	79	27	15	108	18	104	28	92	—	—
20	32	87	30	90	73	35	76	31	20	102	19	103	28	92	27	94
25	28	92	26	96	71	37	75	32	20	102	20	102	30	90	—	—
30	26	96	25	96	68	41	71	37	20	102	21	101	30	90	29	91
35	24	98	25	99	65	45	67	42	24	98	25	96	34	85	35	83
40	26	96	25	96	65	45	65	45	24	98	—	—	34	85	—	—
45	26	96	26	96	61	50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
50	28	92	—	—	—	—	61	50	—	—	—	—	—	—	—	—
55	31	89	31	89	61	50	61	50	27	94	28	92	36	82	37	81
60	—	—	—	—	60	51	60	51	—	—	—	—	—	—	—	—
65	—	—	—	—	58	54	59	52	—	—	—	—	—	—	—	—
80	34	85	35	84	57	55	58	54	31	89	32	87	39	78	38	78
95	37	81	39	78	—	—	—	—	35	84	34	85	40	77	40	77
100	—	—	—	—	56	57	57	55	—	—	—	—	—	—	—	—
135	46	70	45	71	57	55	56	57	—	—	—	—	—	—	—	—

⁹ BLOOR, Journ. Biol. Chem., 24, 227 (1916); 29, 437 (1917).

water may partly paralyse the sulphuric acid. The reaction, however, shows differences in both stages. The acceleration of the first stage remains as though water were not present. The maximum, however, is lower and the sulphuric acid does not suffice for the complete development of the colouring. After having reached the maximum, the diminishing of the colouring begins sooner and more slowly than in normal curves. In BLOOR's extracts alcohol, traces of which may enter the reactionary mixture, must also be reckoned with. Therefore the influence of alcohol on the course of reaction was tested.

IV. series of experiments.

Curves No. 47—62. 5 ccm of chloroform solution of cholesterol. The influence^o of alcohol on the course of reaction.

Table No. 8, 9. Diag. No. VII.

Curves No. 47, 48, 55, 56: no alcohol was added for controlling the reaction.

Curves No. 49, 50: 0,02 ccm of alcohol was added.

TABLE NO. 8.

Curves No. 47.—54.

The influence of alcohol on the course of reaction.

5 ccm of chloroform solution containing 0,44 mg of cholesterol.

Temperature: 16° C.

Curves No. 47, 48: no alcohol was added for controlling the reaction.

Curves No. 49, 50: 0,02 ccm of alcohol was added.

Curves No. 51, 52: 0,04 ccm of alcohol was added.

Curves No. 53, 54: 0,08 ccm of alcohol was added.

Time	47		48		49		50		51		52		53		54	
	K	o/o	K	o/o	K	o/o	K	o/o	K	o/o	K	o/o	K	o/o	K	o/o
10	51	62	60	51	58	54	64	46	79	27	75	32	83	22	85	19
15	38	80	40	77	45	70	50	64	65	45	70	38	75	32	77	30
20	30	90	32	87	40	77	43	73	57	55	59	52	67	42	70	38
25	27	94	26	96	34	85	36	82	48	67	50	64	59	52	63	47
30	25	96	23	99	30	90	32	87	41	71	—	—	52	62	—	—
35	25	96	24	98	28	92	30	90	34	85	35	84	48	67	50	64
40	27	94	27	94	28	92	28	92	35	84	33	86	41	77	42	74
55	31	89	32	87	28	92	30	90	32	87	33	86	39	78	40	77
80	35	84	36	82	35	84	35	84	35	84	35	84	37	81	36	82
95	37	81	35	84	—	—	36	82	37	81	—	—	38	80	38	80

Curves No. 51, 52: 0,04 ccm of alcohol was added.

Curves No. 53, 54: 0,08 ccm of alcohol was added.

Curves No. 57, 58: 0,16 ccm of alcohol was added.

Curves No. 59, 60: 0,32 ccm of alcohol was added.

Curves No. 61, 62: 0,50 ccm of alcohol was added.

Temperature: 16° C.

Summary: The influence of 0,02—0,04 ccm of alcohol is evident. A retardation of the I. stage of reaction begins again. The II. stage is unchanged. The presence of alcohol acts similarly to the presence of water.

If we compare the temperature and form of the curves we notice a slight variation. Thus at a temperature of 16° C the maximum lasts longer and the II. stage, i. e. the fading, begins later. At a temperature of 17° C the bends of the curves are steeper. At a temperature of 22° C the fading begins immediately after the maximum is reached. A temperature of 26° C was also tested.

TABLE No. 9.

Curves No. 55.—62.

The influence of alcohol on the course of reaction.

5 ccm of chloroform solution containing 0,44 mg of cholesterol.

Temperature: 16° C.

Curves No. 55, 56: no alcohol was added for controlling the reaction.

Curves No. 57, 58: 0,16 ccm of alcohol was added.

Curves No. 59, 60: 0,32 ccm of alcohol was added.

Curves No. 61, 62: 0,5 ccm of alcohol was added.

Time	55		56		57		58		59		60		61		62	
	K	o/o	K	o/o	K	o/o	K	o/o	K	o/o	K	o/o	K	o/o	K	o/o
10	54	59	45	70	84	21	87	17	90	13	91	11	98	10	100	0
15	39	78	36	83	78	28	80	26	88	15	90	13	88	15	95	6
20	28	92	27	94	73	39	75	32	84	20	85	19	88	15	88	15
25	26	95	25	96	67	42	74	33	84	20	84	20	88	15	87	17
30	24	98	24	98	61	50	63	47	82	23	83	22	—	—	—	—
35	23	99	22	100	58	54	58	54	78	28	77	29	—	—	—	—
40	27	94	25	96	53	60	52	62	75	32	76	31	86	18	87	17
55	33	86	32	87	49	65	46	70	70	39	69	40	82	23	83	22
80	36	82	34	85	45	71	43	73	62	49	63	47	79	26	78	28
95	38	80	39	77	44	72	43	73	54	58	62	51	—	—	—	—
100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	72	36	70	39

V. series of experiments.

Curves No. 63—70. A pure solution of cholesterol in chloroform. 5 ccm containing 0,4 mg of cholesterol.

Temperature: 26° C.

Results: Table No. 10. Diag. No. VIII.

Summary: The experiments confirm preceding results. Both actions are accelerated, especially the fading of the colouring. The maximum is lost visibly in a few minutes. The variations of errors, however, at this temperature are lower than at other, lower temperatures. The maximums do not mutually change more than 5%.

Later the last series of experiments with BLOOR's alcohol-aether extracts from blood-serum were made. From 5 ccm of serum 5 extracts were prepared, each containing one ccm of serum in 24 ccm of alcohol-aether (3 : 1). From each portion after filtration are taken 2 aliquot parts of 10 ccm each, and evaporated to dessication on electric stoves. The remainder is repeatedly extracted by means of small quantities of chloroform, and chloroform extracts completed to 10 ccm, from which were taken aliquots of 5 ccm each for analysis. Thus all together 20 analyses were made.

VI. series of analysis.

Curves No. 71.—90. Cholesterol in aliquot parts of BLOOR's extracts from blood-serum.

TABLE NO. 10.

Curves No. 63.—70.

A pure solution of cholesterol in chloroform (5 ccm containing 0,4 mg of cholesterol).

Temperature: 26° C.

Time	63		64		65		66		67		68		69		70	
	K	0/0	K	0/0	K	0/0	K	0/0	K	0/0	K	0/0	K	0/0	K	0/0
10	30	99	63	52	40	85	36	90	29	100	43	81	44	78	47	75
15	29	100	56	62	31	98	30	99	29	100	30	99	33	95	30	99
20	33	95	52	67	33	95	33	95	38	80	31	98	31	98	29	100
25	38	80	52	67	40	85	42	82	38	80	38	80	38	80	34	93
30	42	82	49	70	41	83	42	82	43	81	40	85	39	79	—	—

Table No. 11. Diag. No. IX.

Temperature: 20° C.

Summary: Among the results, which differ much more than the pure cholesterol solutions, were observed six in all, especially retarded reactions. Four reactions are less retarded but the limit of error caused by them is approximately 15%. The II. stage of reaction is not retarded, so that if we consider the retarded reactions and the diminished maximum of intensity as their result, we may calculate a correct result for a given temperature, if we prolong the curve of fading of the colouring to the time in which, at that temperature, the maximum of intensity should take place.

If we regard the results obtained we may summarise them roughly as follows:

1. We cannot prevent variations in the course of the LIEBERMANN-BURCHARDT reaction even in the most exact manipulation. The maximums of intensity of colouring are not of same density, and do not take place at the same moment. The errors which thus arise in reading amount normally to 4—8%.

2. In pure solutions a considerable retardation of the reaction occurs as an exception. This retardation appears as a slower increase of intensity of the colouring.

3. If a retarded reaction appears, its intensity does not attain the same degree as non-retarded reaction. The retardation concerns chiefly the I. part of the reaction, i. e. the increase of intensity of the green colouring, whereas the II. part of the reaction, — the decrease in intensity — proceeds in the same manner and at the same speed as in normal reactions. From this I judge that both actions are independent of each other. When the intensity of the colouring reaches the moment when a reverse form of the action — fading — has developed so far that it attains superiority over the first action, the fading proceeds at a normal speed. If both actions were more closely copulated they would have to be regarded to the same degree, and the maximum of intensity would attain the normal rate. The position of the maximum is the result of the speed of both processes. If one action or the other attains the superiority, the maximum change is in the sense of a plus or minus. If both processes were component parts of the same action mutually connected causally (copulated reactions) the

equilibrium between the primary and secondary reaction would be unchanged.

4. A retardation of the I. part of the reaction may be effected by adding small quantities of water or alcohol to the reactionary mixture.

5. An acceleration of the I. part of the reaction may be effected by adding an excess of sulphuric acid.

TABLE NO. 11.

Curves No. 71.—90.

Cholesterol in aliquot parts of Bloor's extracts from blood-serum.

Temperature: 20° C. 100% = 0,328 mg in 5 ccm of chloroform.

Time	71		72		73		74		75		76		77		78	
	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%
15	41	100	45	94	50	85	50	85	47	90	46	92	57	74	60	70
20	41	100	42	99	46	92	48	89	44	95	44	95	53	82	57	74
25	42	99	43	97	44	95	45	94	43	97	42	99	50	85	52	83
30	43	97	44	95	44	95	46	92	42	99	44	95	46	92	49	88
35	44	95	45	94	45	94	47	90	45	94	45	94	45	94	46	92
40	46	92	46	92	55	78	51	84	—	—	—	—	48	89	47	90
45	—	—	49	88	—	—	51	84	—	—	—	—	—	—	—	—
60	—	—	55	78	56	75	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Time	79		80		81		82		83		84		85		86	
	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%	K	%
15	67	58	70	52	50	85	43	97	70	52	62	67	43	97	44	95
20	64	61	60	70	46	92	42	99	54	72	50	85	41	100	42	99
25	58	72	52	82	45	94	43	97	50	85	45	94	42	99	44	95
30	54	78	45	94	44	95	46	92	—	—	—	—	—	—	—	—
35	50	85	—	—	45	94	—	—	49	88	49	88	—	—	—	—
40	49	88	—	—	46	92	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
45	51	84	—	—	49	88	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Time	87		88		89		90	
	K	%	K	%	K	%	K	%
15	43	97	44	95	50	85	49	88
20	41	100	42	99	43	97	45	94
25	41	100	—	—	—	—	45	94
30	43	97	—	—	—	—	44	95
35	45	94	—	—	—	—	45	94

6. An acceleration of both parts of the reaction may be effected by an increase of temperature. The temperature, however, accelerated especially the II. part of the reaction, which fact agrees with the observation of GRIFFON¹⁰ who, at high temperatures observed a sudden appearance of the green colouring which, however, immediately disappeared and turned to a yellow colour.

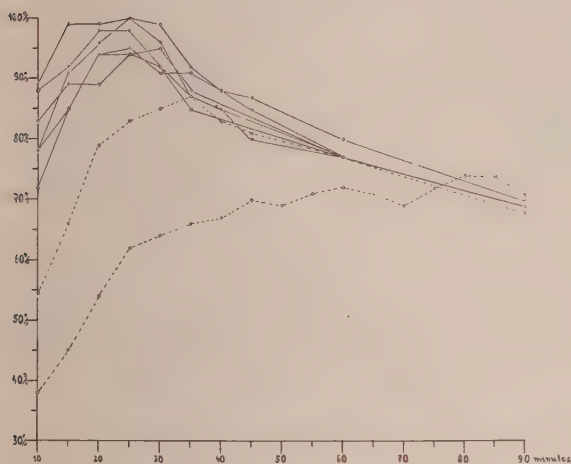
Consequences of experiments for colorimetry.

More exact results may be obtained by a complete but careful dessication of BLOOR's extracts before the extraction by chloroform. It is proper to read in the colorimeter after 15 minutes by artificial light with a red filter, more often at 3—5 minute intervals. If the maximum intensity does not take place within 25 minutes, it is necessary to read until the colour fades. We calculate the correct concentration by the time curve which we prepare for a given temperature according to the process of the fading of the colour of the standard solution. We express the intensity of the colouring in this curve in a percentage of the maximum colouring. For instance: at a temperature of 17° C the colour of the solution fades after 60 minutes at 77% of the maximum rate, attained at the twentyfifth minute. If a retarded reaction with a maximum intensity at the sixtieth minute appears during the analysis of an unknown quantity of cholesterol, the rate is given by reading from the colorimetrical scale only 77% of the true rate. If we read the colorimeter especially at high temperatures the time maximum must be determined with great exactitude, since the fading takes place quickly.

I am well aware that the results I have obtained by a fractional reading of the LIEBERMANN-BURCHARDT reaction do not completely correspond to the real conditions, since by a repeated pouring of the solution from the cuvette of colorimeter to the flask and vice versa, I have interfered with the process of reaction.

Moreover, the results obtained from 90 curves agree fairly well and also enable me to make several new conclusions of the kinetic and mechanism of the reaction.

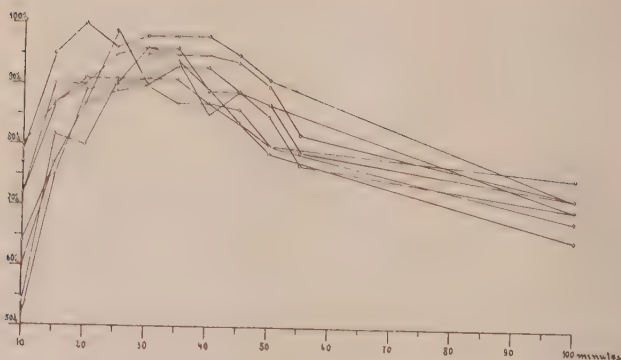
¹⁰ GRIFFON, Compt. Rënd. de la Soc. Biol., **107**, 943 (1931).



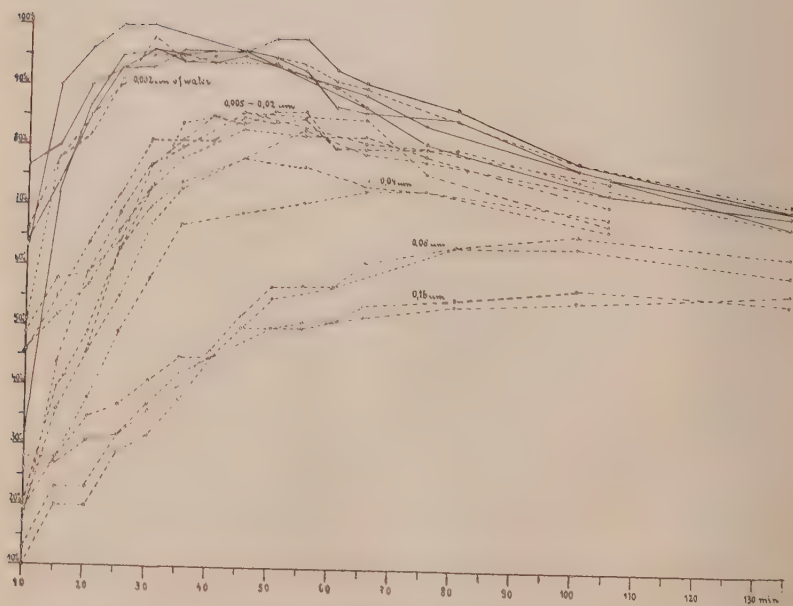
Diag. No. I (for table No. 1).



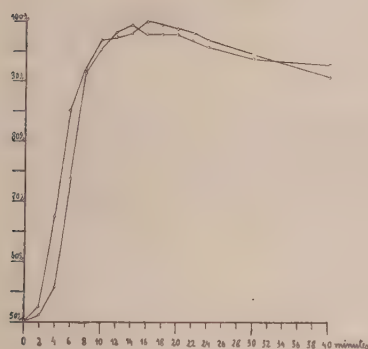
Diag. No. II (for table No. 2).



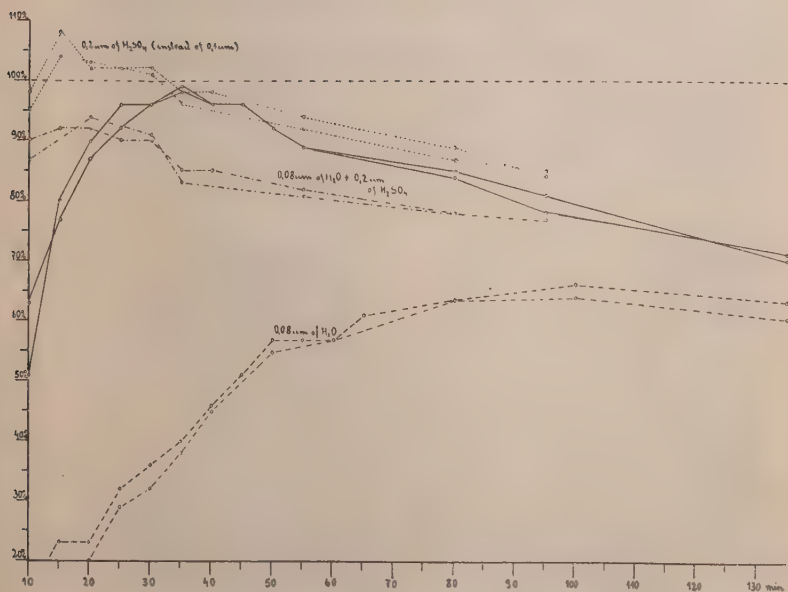
Diag. No. III (for table No. 4).



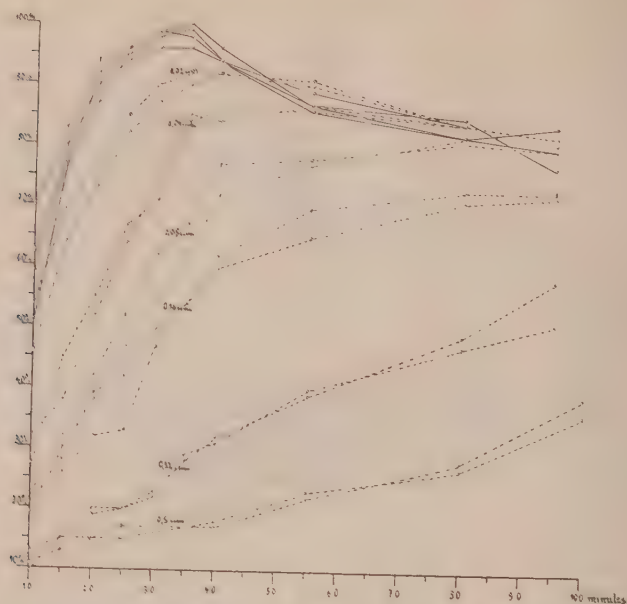
Diag. No. V (for table No. 5-7).



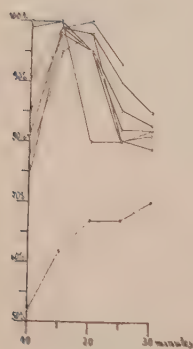
Diag. No. IV (for table No. 3).



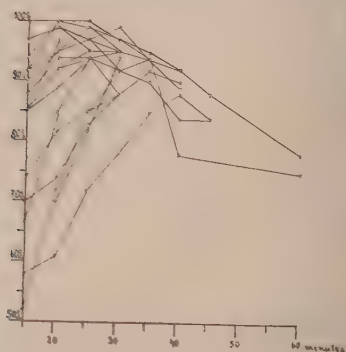
Diag. No. VI (for table No. 7).



Diag. No. VII (for table No. 8 and 9).



Diag. No. VIII
(for table No. 10).



Diag. No. IX
(for table No. 11).

ÜBER DIE VERWENDUNG VON TÜPFELREAKTIONEN ZUM NACHWEIS VON ORGANISCHEN VERBINDUNGEN. (VI.)

Von

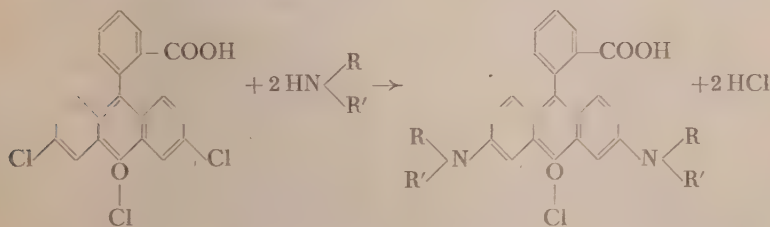
F. FEIGL, V. ANGER und R. ZAPPERT.

Aus dem II. Chemischen Universitätslaboratorium in Wien.

(Eingelangt am 19. Juli 1934.)

Nachweis von aliphatischen und aromatischen Aminen mit Fluoresceinchlorid.

Es ist bekannt, daß sämtliche Verbindungen, die NH_2 -, NH - oder NCH_3 -Gruppen enthalten, beim Schmelzen mit Fluoresceinchlorid und wasserfreiem Zinkchlorid Farbstoffe der Rhodaminreihe liefern¹. Die Bildung der wasserlöslichen Rhodaminfarbstoffe erfolgt gemäß folgender Gleichung:



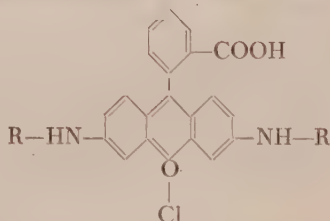
Wir haben diese Umsetzung im Hinblick auf eine analytische Auswertung zum Nachweis von Aminen überprüft und gefunden, daß die hierbei entstehenden Farbstoffe je nach dem Typus des vorliegenden Amins charakteristisch verschieden sind und daher die

¹ P. FRIEDLÄNDER, Handb. d. Teerfarben, II, 79, 81 (1891); III, 174 (1896).

Farbstoffbildung zum Nachweis und zur Unterscheidung von Aminen dienen kann. Die Nachweise lassen sich mit geringen Mengen von Untersuchungsmaterial unter Zuhilfenahme einer Analysenquarzlampe ausführen.

Nachweis primärer aliphatischer Amine.

Beim Verschmelzen primär aliphatischer Amine, bzw. deren Salzen mit Fluoresceinchlorid entstehen gelbgrün fluoreszierende rosa Farbstoffe von der allgemeinen Formel:



Es handelt sich demnach um symmetrisch dialkylierte Rhodamine. Diese zeigen durchweg sowohl im Tageslicht als auch im Uviollicht eine gelbgrüne, intensive Fluoreszenz. Ähnliche Fluoreszenzen zeigen auch die aus Säureamiden (vgl. S. 71) sowie aus Ammonsalzen erzeugten Rhodamine.

Ausführung. Ein Tropfen der salzsauen Probelösung wird in einer Eprouvette oder in einem Mikrotiegel zur Trockene eingedunstet und der Trockenrückstand mit einer Spatelspitze Fluoresceinchlorid und der doppelten Menge Zinkchlorid vermischt. Hierauf wird in einem Luftbad auf 250 bis 260° so lange erhitzt, bis alles Zinkchlorid geschmolzen ist. Bei Verwendung von Mikrotiegeln ist es zweckmäßig, diese in passende Vertiefungen eines Aluminiumblockes zu setzen, der durch eine Brennerflamme erhitzt wird und eine Vertiefung zur Aufnahme eines Thermometers trägt. Die Schmelze wird nach dem Erkalten in alkoholischer Salzsäure gelöst. Bei Anwesenheit von primären aliphatischen Aminen zeigt die Lösung eine gelbgrüne Fluoreszenz. Bei kleinen Aminmengen ist zur Feststellung der Fluoreszenz Beobachtung im Lichte der Analysenquarzlampe erforderlich.

Die mit dieser Methode erreichbaren Erfassungsgrenzen sind aus nachstehender Tabelle I zu entnehmen.

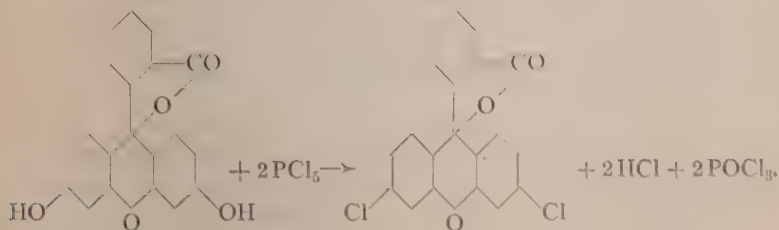
Tabelle I.

Name	Formel	Farbe	Fluoreszenz	Ultraviolett Fluoreszenz	Erleuchtungs- grenze
Ammonchlorid	NH_4Cl	rosa	grün	gelb- grün	30 γ
Hydroxylaminchlorhydrat	$\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$	rosa	grün	gelb	20 γ
Hydrazinsulfat	$\text{NH}_2 \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$	orange	grün	gelb	20 γ
Methylaminchlorhydrat	$\text{CH}_3 \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$	rot	grün	gelb	10 γ
Glykokollesterchlorhydrat	$\text{CH}_2 \cdot \text{COOC}_2\text{H}_5$	rosa	grün	gelb	20 γ
	$\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$				

Reagenzien: 1. Fluoresceinchlorid.
2. Wasserfreies Zinkchlorid.
3. 10%ige alkoholische Salzsäure.

Darstellung von Fluoresceinchlorid².

3,3 g Fluorescein werden mit 4,5 Phosphorpentachlorid gemischt und in einem Kölbchen mit Steigrohr unter Feuchtigkeitsabschluß bis zum Aufhören der HCl Entwicklung auf dem Wasserbad erwärmt.



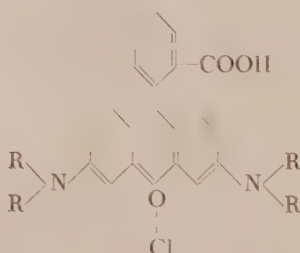
Das Reaktionsgemisch wird mit Wasser ausgekocht, der Rückstand nach Filtrieren in verdünnter Natronlauge suspendiert und mäßig erwärmt, wobei sich das überschüssige Fluorescein löst und unreines Fluoresceinchlorid zurückbleibt. Dieses wird mit Wasser und Alkohol gewaschen und nach Trocknen in wenig heißem Toluol gelöst, die filtrierte Lösung mit doppeltem Volumen Alkohol

² A. v. BAEYER, Liebigs Ann. Chem. 183, 18 (1876).

versetzt und stehen gelassen. Es kristallisiert das reine Fluoresceinchlorid in weißen bis hellorangefarbenen Blättchen aus. Ausbeute zirka 60% der Theorie.

Nachweis sekundärer aliphatischer Amine.

Beim Verschmelzen sekundärer aliphatischer Amine mit Fluoresceinchlorid entstehen tetraalkylierte Rhodamine,



welche in saurer Lösung eine rote Farbe und orangerote Fluoreszenz besitzen. Nach den Fluoreszenzfarben ist demnach eine Unterscheidung zwischen primären und sekundären aliphatischen Aminen möglich, da erstere eine gelbgrüne Fluoreszenz aufweisen.

Die Ausführung des Nachweises erfolgt in gleicher Weise wie bei den primären Aminen.

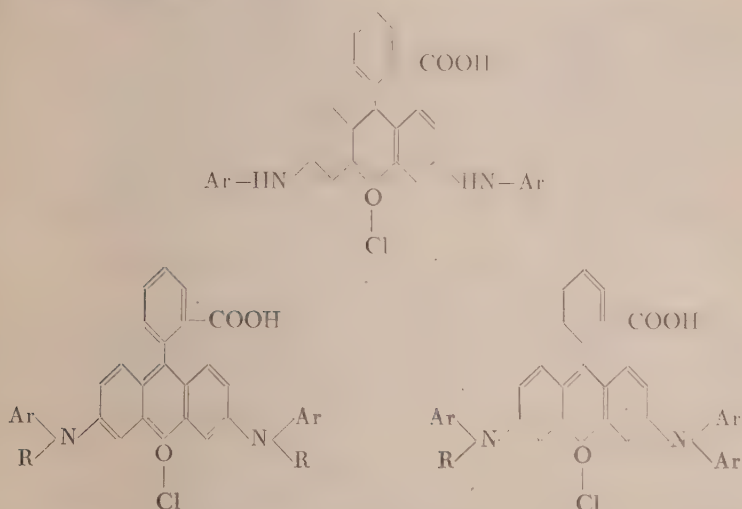
Aus nachstehender Tabelle II sind die bei einigen sekundären Aminen erreichbaren Erfassungsgrenzen zu entnehmen.

Tabelle II.

Name	Formel	Farbe	Fluoreszenz	Ultra-violett Fluoreszenz	Erfassungsgrenze
Diäthylamin	$\text{NH} \begin{matrix} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix}$	rot	orange-rot	orange-rot	4 γ
Piperidin	$\text{NH} \begin{matrix} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{matrix} \text{CH}_2$	rot	rot	orange-rot	4 γ
Acetursäure-ester	$\text{CH}_3-\text{COOC}_2\text{H}_5$ $\text{NH} \cdot \text{COCH}_3$	orange	orange	orange-gelb	20 γ

Nachweis aromatischer Amine.

Primäre, sekundäre und eine Methylgruppe enthaltende tertiäre aromatische Amine liefern beim Schmelzen mit Fluoresceinchlorid Farbstoffe folgender Typen:



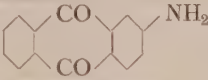
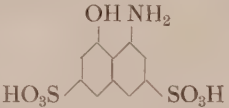
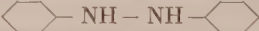
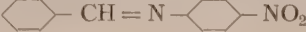
Die salzsauren alkoholischen Lösungen dieser Farbstoffe sind intensiv rotviolett gefärbt, doch weisen diese Lösungen im Gegensatz zu den aus aliphatischen Aminen gebildeten Rhodaminen keine Fluoreszenz auf. Das Auftreten oder Ausbleiben einer Fluoreszenz ermöglicht demnach eine Unterscheidung zwischen aliphatischen und aromatischen Aminen. Ebenso wie die Amine reagieren deren Benzalverbindungen.

Ausführung der Reaktion ist analog der bei den primären aliphatischen Aminen. Aus der nachstehenden Tabelle III sind die bei verschiedenen aromatischen Aminen erreichbaren Erfassungsgrenzen zu entnehmen.

Nachweis von Säureamiden und Säurenitrilen.

Säureamide verhalten sich beim Schmelzen mit Fluoresceinchlorid wie primäre aliphatische Amine, desgleichen auch Säurenitrile, da

Tabelle III.

Name	Formel	Farbe	Erfassungsgrenze
Anilin		rotviolett	5 γ
α-Naphtylamin		dunkelviolett	5 γ
β-Naphtylamin		rotviolett	2 γ
β-Aminoantrachinon		rot	4 γ
Benzidin	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$	rotviolett	4 γ
o-Aminobenzaldehyd		rot	2 γ
p-Nitranilin	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$	rotviolett	5 γ
p-Phenylendiamin	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$	purpur	1 γ
p-Chloranilin	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Cl}$	purpur	4 γ
H-Säure		rotviolett	10 γ
Diphenylamin		purpur	8 γ
Hydrazobenzol		purpur	4 γ
Acetanilid		scharlachrot	4 γ
Benzolsulfo-p-Nitranilid		blauviolett	4 γ
p-Dimethylaminobenzaldehyd	$\text{OHC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	kirschrot	4 γ
Michlersches Keton	$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	rot	2 γ
Diäthylanilin		rosa	400 γ
Benzyliden-p-Nitranilin		braunviolett	8 γ

diese hierbei zu Säureamiden verseift werden. Die solcherart entstehenden Rhodaminfarbstoffe sind bisher nicht isoliert worden; wahrscheinlich ist die Bildung analoger Verbindungen wie bei den primären Aminen.

Die Ausführung des Nachweises hat nach der bei den primären aliphatischen Aminen gegebenen Vorschrift zu erfolgen, doch ist zu beachten, daß die Probelösung nur neutral eingedunstet werden darf, da in saurer Lösung Verseifung des Säureamids erfolgen kann. Es entstehen Farbstoffe mit gelber Fluoreszenz.

Aus der nachstehenden Tabelle IV sind die bei verschiedenen Säureamiden erreichbaren Erfassungsgrenzen zu entnehmen.

Nachweis von Pyrrolderivaten.

Pyrrolderivate geben beim Schmelzen mit Fluoresceinchlorid und Zinkchlorid gelbbraune Farbstoffe, welche im Uviollicht blau fluoreszieren. Diese Reaktion läßt sich zum Nachweis von Pyrrolderivaten verwenden.

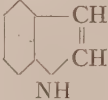
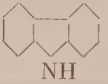
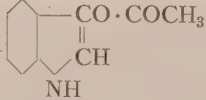
Tabelle IV.

Name	Formel	Farbe	Fluoreszenz	Ultraviolett Fluoreszenz	Erfassungs- grenze
Acetamid	$\text{CH}_3 \cdot \text{CONH}_2$	orange		gelb	20 γ
Benzamid	$\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CONH}_2$	orange	grün	gelbgrün	20 γ
Semicarbazid	$\text{CO} \begin{array}{l} \text{NH} \cdot \text{NH}_2 \\ \text{NH}_2 \end{array}$	kirschrot	orangegelb	orangegelb	20 γ
Phtalimid	 $\text{CO} \rangle \text{NH}$ CO	gelb		gelb	40 γ
Saccharin	 $\text{CO} \rangle \text{NH}$ SO_2	rot		gelb	50 γ

Die Ausführung des Nachweises ist die gleiche wie bei den vorhergehenden; das Eindampfen der Probelösung kann in neutraler oder alkalischer Lösung erfolgen.

Aus der nachstehenden Tabelle V sind die bei verschiedenen Pyrrolderivaten erreichbaren Erfassungsgrenzen zu entnehmen.

Tabelle V.

Name	Formel	Farbe	Ultraviolett Fluoreszenz	Erfassungsgrenze
Pyrrol	$ \begin{array}{c} \text{HC} - \text{CH} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{HC} \quad \text{CH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH} \end{array} $	verkohlt	blau	40 γ
Indol		braunrot	blau	12 γ
Carbazol		gelbgrün	blau	30 γ
Acetindoxyl		braunrot	blau	20 γ

Nachweis von primären aromatischen Aminen mit Glutaconaldehyd.

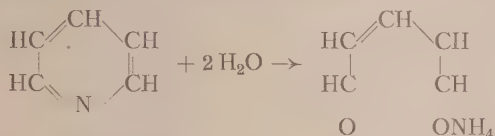
H. FREYTAG und W. NEUDERT³ haben gezeigt, daß mit Uviollicht bestrahltes Pyridin in saurer Lösung mit primären aromatischen Aminen farbige Produkte liefert und zum Nachweis solcher Amine Antüpfeln auf mit Pyridin imprägniertem und nachher mit Uviollicht bestrahltem Papier empfohlen. Hierbei entstehen farbige (zumeist rote) Flecke, durch die noch sehr kleine Mengen primärer aromatischer Amine nachweisbar sind.

Wir haben an anderer Stelle⁴ über unsere Versuche zur Auf-

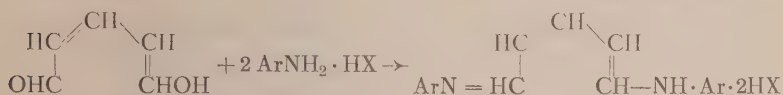
³ J. prakt. Chem., **185**, 15 (1932).

⁴ F. FEIGL und V. ANGER, J. prakt. Chem., **189**, 180 (1934).

klärung des Chemismus dieses von den genannten Autoren als „Photopyridinreaktion“ bezeichneten Nachweises berichtet; die Versuche haben ergeben, daß bei der Bestrahlung von Pyridin mit ultraviolettem Licht durch Hydrolyse gemäß

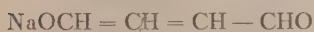


zunächst das Ammoniumsalz der Enolform des Glutaconaldehyds entsteht, das dann in saurer Lösung mit primären aromatischen Aminen Kondensationsprodukte nach Art der SCHIFF'schen Basen liefert.

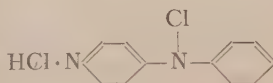


Man kann daher nach unseren Befunden primäre aromatische Amine, statt mit der Photopyridinreaktion, direkt mit Glutaconaldehyd durch Bildung von farbigen SCHIFF'schen Basen erkennen.

Freier Glutaconaldehyd ist infolge Polymerisation sehr unbeständig; auch das durch Bestrahlung von mit Pyridin imprägniertem Papier gebildete Ammonsalz des Glutaconaldehyds zersetzt sich nach einigen Tagen. Wir empfehlen daher, zum Nachweis primärer aromatischer Amine solche Verbindungen zu verwenden, die Glutaconaldehyd leicht abspalten. Als derartige Verbindungen kommen das haltbare Natriumglutaconaldehydenolat (I) sowie das 4-Pyridyl-pyridiniumdichlorid (II) in Betracht:



I



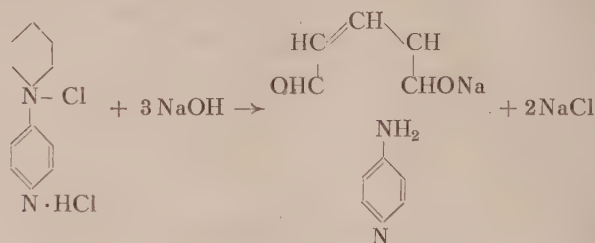
II

Beide Verbindungen sind leicht zugänglich, haltbar und machen die Verwendung einer Quarzlampe überflüssig, was jedenfalls ein Vorteil ist.

Das 4-Pyridyl-pyridiniumdichlorid (II)⁵ spaltet sich durch Zusatz

⁵ E. KOENIGS und H. GREINER, Ber. **64**, 1049 (1931).

von Alkali momentan in das Alkalisalz des Glutaconaldehydenols und 4-Aminopyridin gemäß



wodurch das Reagens in Freiheit gesetzt wird und bei Gegenwart primärer aromatischer Amine nach Ansäuern sofort eine farbige SCHIFF'sche Base liefert.

Ausführung: Man bringt in einen Mikrotiegel je einen Tropfen der Probelösung und der Reagenzlösung, macht mit zwei Tropfen Natronlauge alkalisch und fügt sofort drei Tropfen Salzsäure hinzu. Bei Anwesenheit eines primären aromatischen Amins treten intensiv rote bis violette Färbungen, bezw. Niederschläge auf⁶.

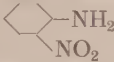
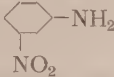
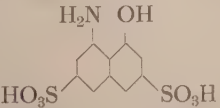
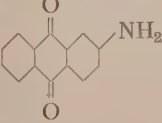
Man kann auch Tüfelpapier mit einer alkoholischen Lösung von Natriumglutaconaldehydenolat (bereitet durch Zufügen von Natronlauge zu einer alkoholisch wäßrigen Lösung von 4-Pyridylpyridiniumdichlorid) tränken und auf das getrocknete Papier mit der warmen, schwach mineralsauren Probelösung tüpfeln. Es entstehen dann auf dem schwach bräunlichen Papier rote, violette oder braune Farbflecke; bei Abwesenheit von Aminen bildet sich auf dem Papier infolge Zerstörung des Natriumglutaconaldehydenolats ein weißer Fleck.

Die mittels der angegebenen Reaktion bei verschiedenen Aminen erreichbaren Erfassungsgrenzen sind aus Tab. VI zu entnehmen.

- Reagenzien:
1. 1%ige Lösung von 4-Pyridylpyridiniumdichlorid.
 2. 2n-Natronlauge.
 3. 2n-Salzsäure.

⁶ 4-Aminopyridin verhält sich nicht wie ein primäres aromatisches Amin, daher entsteht bei der Spaltung von 4-Pyridylpyridiniumdichlorid in Abwesenheit von primären aromatischen Aminen keine farbige SCHIFF'sche Base.

Tabelle VI.

Name	Formel	Erfassungsgrenze	Farbe
Anilin		0,1 γ	rotbraun
o-Nitranilin		1 γ	rosenrot
m-Nitranilin		1 γ	bläulichrot
p-Nitranilin		0,3 γ	rosenholzrot
p-Chloranilin		1 γ	rot
o-Aminobenzaldehyd		0,4 γ	orange
p-Phenylendiamin		0,1 γ	violett
p-Aminodiphenyl		1 γ	rot
Benzidin		0,1 γ	rotbraun
α-Naphtylamin		0,05 γ	scharlachrot
β-Naphtylamin		0,1 γ	rot
1,8-Naphtylendiamin		1 γ	rotbraun
H-Säure		2 γ	rotorange
β-Aminoanthrachinon		1 γ	lila

Darstellung von 4-Pyridyl-pyridinium-dichlorid⁷.

16 g Pyridin werden langsam mit 50 g Thionylchlorid versetzt und das Gemisch drei Tage stehengelassen. Dann wird das überschüssige Thionylchlorid durch Absaugen im Vakuum bei 100° entfernt (eine Stunde erhitzen), der Rückstand mit 15 cm³ Alkohol durchgerührt und abgesaugt. Das Rohprodukt wird in verdünnter Salzsäure gelöst, mit Tierkohle oder Fullererde gekocht, filtriert und das Filtrat bis zum beginnenden Abscheiden von Kristallen eingedampft. Hierauf wird mit etwas Alkohol angerieben, nach vollendeter Kristallisation abgesaugt und mit Alkohol gewaschen. Schmp. 173°. Ausbeute 12 g.

⁷ E. KOENIGS und H. GREINER, loc. cit.

ÜBER DIE VERWENDUNG VON TÜPFELREAKTIONEN ZUM NACHWEIS VON ORGANISCHEN VERBINDUNGEN. (VII.)

Von

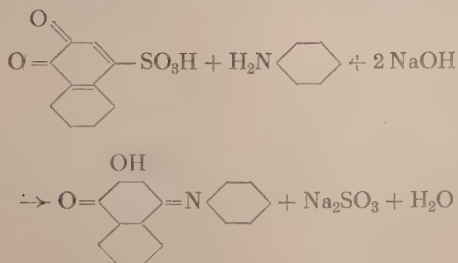
F. FEIGL und O. FREHDEN.

Aus dem II. Chemischen Universitätslaboratorium in Wien.

(Eingelangt am 19. Juli 1934.)

Nachweis reaktionsfähiger CH_2 - und NH_2 - Gruppen.

Nach P. EHRLICH und C. A. HERTER¹ reagiert 1,2-Naphtochinon-4-sulfosäure in alkalischer Lösung mit Verbindungen, welche zwei an einem Kohlenstoff oder Stickstoffatom gebundene, bewegliche Wasserstoffatome enthalten, unter Bildung tief gefärbter, chinoider Kondensationsprodukte. Die hierbei stattfindende Reaktion ist beispielsweise bei Anilin durch folgende Gleichung darstellbar:



¹ Ztschr. physiol. Chem., **41**, 329 (1904).

Tabelle I.

Nr.	Name	Formel	Erfassungsgrenze in γ	Farbe		Anmerkung
				in alkal. Lösung	Mit CH_2COOH	
1	Malonester	$\begin{array}{c} \text{COOC}_2\text{H}_5 \\ \diagdown \\ \text{CH}_2 \\ \diagup \\ \text{COOC}_2\text{H}_5 \end{array}$	1,2	tiefviolett	hellgelb und gelber Niederschlag	
2	Rhodanin	$\begin{array}{c} \text{HN}-\text{CO} \\ \quad \\ \text{SC} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \diagdown \\ \quad \text{S} \end{array}$	0,6	tief blauviolett	rotgelber Niederschlag	
3	Acetessigsäure-äthylester	$\text{CH}_3\text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOC}_2\text{H}_5$	1,2	blutrot bis violett	hellgelb und gelber Niederschlag	Reaktion sehr langsam; Enolform!
4	Rhodalessigsäure	$\begin{array}{c} \text{CNS} \\ \\ \text{CH}_2\text{COOH} \end{array}$	0,6	rotbraun	orange	
5	Dibenzoylmethan	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{C}_6\text{H}_5$	12	rotviolett	weißgelber Niederschlag	Längere Zeit stehen lassen
6	m-Nitranilin	$\begin{array}{c} \text{NO}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	6	gelbbraun	karminroter Niederschlag	Etwas stehen lassen
7	Benzylamin	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2 \cdot \text{NH}_2$	0,6	grün	bräunlich-rot	
8	Semicarbazid	$\begin{array}{c} \text{NH} \cdot \text{NH}_2 \\ \diagdown \\ \text{CO} \\ \diagup \\ \text{NH}_2 \end{array}$	0,6	rotorange	lichtgelb	

Tabelle I. (Fortsetzung.)

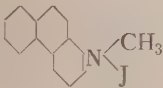
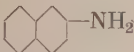
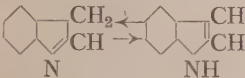
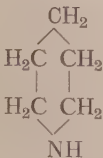
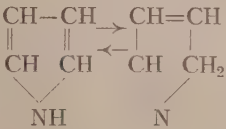
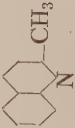
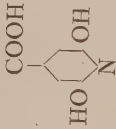
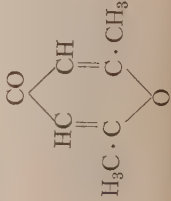
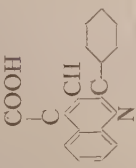
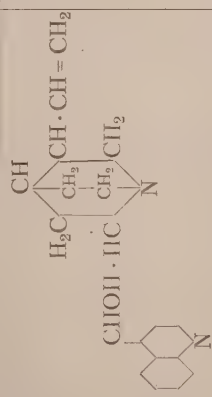
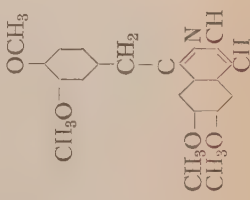
Nr.	Name	Formel	Erfassungs- grenze in γ	Farbe		Anmerkung
				in alkal. Lösung	Mit CH ₂ COOH	
9	Anilin		0,12	ziegelrot	hell- rotorange	
10	β-Naphto- chinolinjod- methylat		1,2	dunkel- violett; Verfärbung in Blau- grün	gelb- brauner Nieder- schlag	
11	β-Naphtyl- amin		0,6	gelbrot bis rotbraun	karmin- roter Nieder- schlag	
12	Indol		0,6	smaragd- grün	erst violett, dann farb- los bis blaugrau	
13	Piperidin		0,6	scharlach- rot	lichtroter Nieder- schlag	Sehr inten- sive Färbung. Reaktion ohne Alkali- zusatz
14	Pyrrol		0,6	tief violett	dunkel- olivgrün	Sehr inten- sive Färbung

Tabelle II.

Nr.	Name	Formel	Methylierungs- mittel	Farbe		Erfassungs- grenze	An- merkung
				mit NaOH	mit CH_3COOH		
1	Pyridin		JCH_3 $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ BrC_2H_5	rot bis rotviolett	gelborange	12 γ	
2	α-Picolin		JCH_3 $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ BrC_2H_5	dunkel- blauviolett	hellgelb	12 γ	
3	Chinolin		JCH_3 $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ BrC_2H_5	tief braun- grün bis schwarzgrün	rosa	25 γ	
4	Chinaldin		JCH_3 $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$	dunkel- blauviolett bis blaugrün	licht- grünlich- gelb	12 γ	
5	2,6-Dioxy- pyridin-4- carbonsäure		JCH_3	schwarzgrün	rosa Schlieren, dann grüner Niederschlag	25 γ	
6	Dimethyl- pyron		JCH_3 $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ BrC_2H_5	braunviolett, nach kurzem Stehen schwarzgrün	Rotfärbung, dann dunkelroter Niederschlag	25 γ	

7	Chelidon- säure		JCH ₃	tief dunkel- olivgrün schwarzgrün	pflirsichrot	25 γ	Ohne NaOH kirschrot Ohne NaOH dunkelrot
8	o-Nitranilin		(CH ₃) ₂ SO ₄	grünlichgelber Niederschlag			
9	p-Nitranilin		(CH ₃) ₂ SO ₄	dunkelgrün			
10	Atophan		JCH ₃ Im Ein- schlußrohr mehrere Stunden erhitzt	milchigweißer Niederschlag, nach längerem Stehen orange	hellgelb		
11	Cinchonin		JCH ₃ Im Ein- schlußrohr mehrere Stunden erhitzt	kirschrot	gelb	100 γ	
12	Papaverin		JCH ₃ Im Ein- schlußrohr mehrere Stunden erhitzt	licht- violettblau, nach längerem Stehen orange- bis dunkelrot	hellgelb		

Die an der momentanen Bildung farbiger Produkte leicht kenntliche Kondensation tritt wohl bei zahlreichen Verbindungen mit zwei beweglichen Wasserstoffatomen ein, ist aber trotzdem nur für Orientierungsprüfungen geeignet, da die Reaktionsfähigkeit von CH_2 - und NH_2 -Gruppen durch andere im Molekül der Verbindung vorhandene Atomgruppen beeinflusst werden kann. So sind beispielsweise Abkömmlinge des Anilins mit stark negativen Gruppen, wie etwa Trinitroanilin oder Tribromanilin im Gegensatz zu Anilin nicht mehr befähigt, sich unter den Versuchsbedingungen mit 1,2-naphtochinon-4-sulfosaurem Natrium zu kondensieren.

Ausführung. Eine kleine Menge der zu untersuchenden festen Substanz oder ein Tropfen einer Lösung wird in einen Mikrotiegel gebracht, mit zwei Tropfen einer Lösung von 1,2-naphtochinonsulfosaurem Natrium versetzt und mit zwei Tropfen Lauge alkalisch gemacht, wobei eine intensive Färbung auftritt. Beim Ansäuern mit Essigsäure erfolgt ein deutlicher Farbumschlag, zuweilen auch Bildung eines Niederschlages.

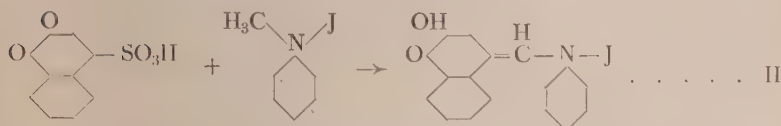
- Reagenzien:** 1. Gesättigte Lösung von 1,2-naphtochinon-sulfosaurem Natrium in 50%igem Alkohol (frisch bereitet).
2. 0,5 n-Natronlauge.
3. 2 n-Essigsäure. .

Die mit der beschriebenen Reaktion bei verschiedenen Verbindungen erreichbaren Erfassungsgrenzen sind aus Tabelle I zu entnehmen.

Die vorstehend beschriebene Reaktion scheint nach unseren Versuchen auch zum Nachweis von cyclischen tertiären Ringbasen sowie von Oxoniumverbindungen geeignet zu sein, da diese durch Quaternisierung in Verbindungen übergeführt werden, die mit 1,2-naphtochinonsulfosaurem Natrium unter Bildung farbiger Produkte reagieren. In Anlehnung an neuerdings von F. KRÖHNKE² beschriebene Kondensationen von Jodmethylenen tertiärer Basen

² Ber., 66, 604 und 1386 (1933).

mit Aldehyden nehmen wir an, daß die bei der Quaternisierung an das Stickstoffatom gebundenen CH₃-, bzw. C₂H₅-Gruppen die Kondensation mit naphtochinonsulfosaurem Natrium bewerkstelligen. Der Nachweis von tertiären Stickstoffbasen und Oxoniumverbindungen durch Quaternisierung und darausschließender Umsetzung mit naphtochinonsulfosaurem Natrium ließe sich demnach durch die Reaktionsgleichungen I und II formulieren, deren experimentelle Verifizierung bisher allerdings noch aussteht.



Ähnliche Reaktionsgleichungen lassen sich auch bei Verwendung anderer Alkylierungsmittel, wie Dimethylsulfat, Bromäthyl, Jodäthyl und p-Bromtoluolsulfosäuremethylester aufstellen. Am besten gelingt die Quaternisierung mit Jodmethyl und Dimethylsulfat.

Ausführung. Eine kleine Menge der zu prüfenden Substanz (fest oder ein Tropfen einer Lösung) wird in einem hohen Mikrotiegel mit 5 bis 6 Tropfen Methyljodid oder Dimethylsulfat auf einer Asbestplatte mit einem Mikrobrenner zum gelinden Sieden erhitzt. Bei schwer quaternisierbaren Substanzen ist die Anlage- rung von Jodmethyl in einem geschlossenen Kapillarröhrchen durch mehrstündiges Erhitzen im Wasserbad bei 100° vorzunehmen. Zu dem quaternisierten Produkt werden 2 bis 3 Tropfen einer gesättigten Lösung von naphtochinonsulfosaurem Natrium zugefügt und hernach mit Natronlauge alkalisch gemacht; eine auftretende Färbung, bzw. Farbumschlag zeigt den positiven Ausfall der Reaktion an. Durch Ansäuern mit Essigsäure wird wie bei der EHRlich-HERTER'schen Reaktion auf CH₂-, bzw. NH₂-Gruppen (vgl. S. 79) ein Farbwechsel hervorgerufen.

- R e a g e n z i e n :
1. Methyljodid oder Dimethylsulfat.
 2. Gesättigte wäßrige Lösung von 1,2-naphtochinonsulfosaurem Natrium.
 3. 0,5 n-Natronlauge.
 4. 1 n-Essigsäure.

Die mit Hilfe der vorstehend beschriebenen Methode bei verschiedenen Verbindungen erreichbaren Erfassungsgrenzen sind aus Tabelle II zu entnehmen.

SAMMELREFERAT: KOHLEHYDRATE.

II. TEIL.

QUALITATIVE MIKROREAKTIONEN DER KOHLEHYDRATE UND IHRE ANWENDUNG FÜR PRAKTISCH-ANALYTISCHE ZWECKE, INSBESONDERES ZUR LEBENSMITTELKONTROLLE. VERWENDUNG VON QUANTITATIVEN MIKROVERFAHREN IN DER LEBENSMITTELINDUSTRIE UND ZUR LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG. FORTSCHRITTE DER MIKROCHEMISCHEN KOHLEHYDRATANALYSE IN DEN JAHREN 1931—1934.

Von

ALFRED WASITZKY,

Wien.

(Eingelangt am 19. Juni 1934.)

Das vorliegende Sammelreferat, dessen erster Teil von Z. DISCHE¹ im Jahre 1931 in derselben Zeitschrift veröffentlicht wurde, soll einen Überblick über die verschiedenartigen Anwendungsmöglichkeiten der mikrochemischen Methoden zur Untersuchung der Kohlehydrate bieten. Im vorgenannten ersten Teil des Sammelreferates Kohlehydrate wurde eine Darstellung der Mikrobestimmungsmethoden der Kohlehydrate in reinen Lösungen und in Bestandteilen des tierischen Körpers gebracht. Eine solche Übersicht ist nicht nur für den Biologen, sondern auch für den in anderen Gebieten tätigen Chemiker von Interesse, da die Entstehung und Weiterentwicklung mikrochemischer Kohlehydratbestimmungsmethoden durch den Bedarf an solchen Methoden in der Biologie und Medizin angeregt wurde. Umgekehrt danken aber diese Disziplinen dem Bestreben solcher Methoden die größten Erfolge in der Erforschung der Phy-

¹ Mikrochemie, X, 128 (1931).

siologie und Pathologie des Kohlehydratstoffwechsels, wobei z. B. auf die Rolle der Blutzuckerbestimmung in der modernen Diabetes-therapie hingewiesen sei. Es wäre aber unrichtig, wenn man annehmen wollte, daß sich die Bedeutung der Mikrokohlehydratbestimmungen in ihrer Anwendung für biologische Zwecke beschränkt, da eben auf diesem Gebiete mit kleinen Mengen von Untersuchungsmaterial, bezw. mit Schwierigkeiten in der Beschaffung desselben zu rechnen ist, während bei der Untersuchung von Warenproben oder Zwischenprodukten der Erzeugung stets ausreichende Mengen zur Untersuchung zur Verfügung stehen. Gegen eine derartige Annahme wären vor allem zwei Gründe ins Treffen zu führen. Erstens werden durch Anwendung von Mikromethoden namhafte Ersparnisse sowohl an Zeit wie an Reagenzien gemacht, die sich besonders bei Serienuntersuchungen vorteilhaft bemerkbar machen. Zweitens bieten Mikromethoden die Möglichkeit, auch Spuren der gesuchten Stoffe auszufinden, die sonst im Makroverfahren nicht mehr nachzuweisen und zu bestimmen sind. Letzterer Zweig der mikroanalytischen Tätigkeit, der von F. EMICH mit dem prägnanten Ausdrucke „Spurensuche“ bezeichnet wurde, spielt besonders bei der Feststellung einer Verfälschung von Lebensmitteln eine höchst bedeutende Rolle. In der Tat haben sich aus den genannten Gründen Mikromethoden zur Kohlehydratbestimmung sowohl in den Fabriklaboratorien wie auch in den Lebensmitteluntersuchungsanstalten seit längerer Zeit eingebürgert und werden dort mit gutem Erfolg verwendet, wie im folgenden gezeigt werden soll. Als Ergänzung werden dann im Anschluß an die Besprechung dieser Methoden die neueren, in den Jahren 1931—1934 erschienenen Mikromethoden zur Kohlehydratbestimmung im biologischen Material Erwähnung finden.

A. Qualitativer mikrochemischer Nachweis der Kohlehydrate.

Zum Nachweis von Pentosen empfiehlt H. SZANZER² das BIAL'sche Reagens (Lösung von Orcin in eisenhaltiger Salzsäure). Pentosen geben mit diesem Reagens eine smaragdgrüne Färbung. Saccharose zeigt damit Braunfärbung. Glucose und Lactose geben nach längerem Kochen mit dem BIAL'schen Reagens ebenfalls Braun-

² Pharmaz. Zentralhalle, **70**, 649 und 663 (1929).

färbung. Die Reaktion auf Pentosen gelingt nur bei Abwesenheit der genannten anderen Zuckerarten, da die grüne Farbe durch die Braunfärbung verdeckt wird. Fehlt dem BIAL'schen Reagens das Eisenchlorid, so tritt mit Pentosen, Glucose und Lactose keine Reaktion ein, wohl aber mit Lävulose. Das Eisenchlorid kann auch durch andere Oxydantien, wie Salpetersäure, Kaliumpermanganat oder Chlorkalk, ersetzt werden, doch erhält man dann andere Farbnancen. Empfindliche Reaktionen entstehen, wenn eine Zuckerlösung mit der alkoholischen Lösung von Thymol, α -Naphthol, β -Naphthol, Vanillin oder Eugenol vermischt und mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet wird. Man erhält so farbige Ringzonen, z. B. mit α -Naphthol einen dunkelblauen Ring, und beim Schütteln eine dunkelblaue trübe Lösung. Versetzt man diese mit destilliertem Wasser, so fällt ein blauer Niederschlag aus. Pentosen, Glucose, Maltose, Lactose, Saccharose, Dextrin, Inulin und Stärke geben nach P. BRUÈRE³ mit konzentrierter Schwefelsäure und einem Tropfen alkoholischer Guajacollösung charakteristische Farbreaktionen. Z. DISCHE⁴ berichtet über eine Reaktion der Kohlehydrate mit Carbazol. Eine 0,5%ige Lösung von Carbazol in Alkohol gibt mit Kohlehydraten und aliphatischen Aldehyden sowie mit α -Oxysäuren, die durch konzentrierte Schwefelsäure in Aldehyde übergeführt werden, schöne Farbreaktionen. An anderer Stelle beschreibt derselbe Autor⁵ ein Verfahren, welches die Identifizierung einzelner Zucker in Gemischen ermöglicht. In dieser Arbeit gibt der Verfasser genaue Vorschriften zur Durchführung der Reaktionen mit α -Naphthol und Schwefelsäure, sowie mit Diphenylamin und Salzsäure und schließlich mit Phloroglucin und Schwefelsäure, nach Studium ihrer optimalen Bedingungen, an. Mit Hilfe dieser Reaktionen ist es dem Verfasser möglich, selbst geringste Beimengungen von Mannose, Fructose, Galaktose und anderen Zuckern bis zu Konzentrationen von 0,001% nicht bloß zu erkennen, sondern auch mit einer gewissen Genauigkeit zu bestimmen. Bezüglich weiterer Einzelheiten sei auf das Original verwiesen. (Siehe auch Sammelreferat: Kohlehydrate, I. Teil, Seite 152.) Eine Methode zur Identifizierung kleinster Zuckermengen auf Grund ihrer charakteristischen

³ Bull. Soc. chim. Biol., 8, 462 (1925); C., 1926, II, 2988.

⁴ Biochem. Ztschr., 189, 77 (1927).

⁵ Mikrochemie, VII, 33 (1927).

Kristallformen wurde von G. DENIGES⁶ ausgearbeitet. Das Prinzip des Verfahrens beruht darauf, daß aus einem Kristallbrei der zu untersuchenden Substanz nach Impfung mit einem Mikrokriställchen derselben Zuckerart und Behandlung mit geeigneten Lösungsmitteln der Zucker rein auskristallisiert. 0.1 bis 0.2 mg Substanz werden in einem kleinen Tröpfchen Wasser gelöst und bis zur glasigen Konsistenz eingedampft. Dann wird der Rückstand mit einem Impfkristall und mit einem Gemisch gleicher Teile Aceton und Eisessig behandelt. Da eine absolute Isomorphie verschiedener Verbindungen als praktisch ausgeschlossen gelten kann, bietet das Verfahren, wie der Verfasser bemerkt, ein sicheres Mittel zur Identifizierung von Spuren der Zucker. Zur Herstellung der Impfkristalle gibt der Verfasser eine eigene Vorschrift an. J. H. FOULGER⁷ berichtet über eine Modifikation der MOLISCH-Reaktion zur Untersuchung von Zuckern in biologischer Flüssigkeit. Die gebildeten Färbungen werden spektroskopisch untersucht. L. EKKERT⁸ findet, daß die verschiedenen Zuckerarten sowie Stärke nicht nur mit α -Naphthol, Kresol, Thymol und Guajacol, sondern auch mit Resorcin, β -Naphthol, Morphin, Codein, Phenacetin und Naphthylamin schöne Farbreaktionen zeigen. Zur Durchführung dieser Reaktionen gibt er folgende Vorschrift an: 5 bis 10 mg Substanz werden mit der gleichen Menge eines der genannten Reagenzien und 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure zusammengebracht. Der Verfasser beschreibt die Farbreaktionen mit Arabinose, Xylose, Rhamnose, Glucose, Mannose, Galaktose, Fructose, Saccharose, Lactose, Maltose, Dextrin, Glykogen und löslicher Stärke. L. ROSENTHALER⁹ untersucht das Verhalten verschiedener Kohlehydrate und Glykoside gegen Alkaloidfällungsmittel. Er wählt für diesen Zweck 25%ige Bromwasserstoffsäure mit einem Zusatz von 10% Brom sowie 10%ige Silicowolframsäure, 10%ige Phosphormolybdänsäure und 1%ige Tanninlösung. Der Verfasser beschreibt dann die Fällungsreaktionen der einzelnen Kohlehydrate und zieht daraus den Schluß, daß dann eine Fällung mit den genannten Reagenzien zu erwarten ist, wenn die durch die Brückensauerstoffatome bewirkte Basizität nicht

⁶ Bull. Soc. pharm. Bordeaux, **63**, 3 (1925). Mikrochemie, **III**, 33 (1925).

⁷ Journ. of biol. Chem., **92**, 349 (1932); C., **1933**, I, 3991.

⁸ Ber. d. ungar. pharmaz. Ges., **4**, 234 (1928).

⁹ Pharmac. Acta helvet., **3**, 93 (1928).

allzusehr durch Hydroxyl- oder irgendwelche andere saure Gruppen des Moleküls abgeschwächt wird. P. THOMAS und E. MARTEL¹⁰ geben Farbreaktionen verschiedener Kohlehydrate mit Tryptophan und Indol nach folgender Vorschrift an. 2 ccm einer 1%igen Lösung von Tryptophan in konzentrierter Salzsäure werden mit der gleichen Menge der zu untersuchenden Zuckerlösung, mit einem Gehalt von einigen Milligramm Zucker, eine Minute lang auf 100° C erhitzt. Xylose, Rhamnose, Fructose und Sorbose zeigen dabei eine rotbraune Färbung, Arabinose gibt eine gelbbraune, Galaktose eine braune und Glucose eine amethystviolette Färbung. Bei Verwendung einer 1%igen Lösung von Tryptophan in Salzsäure 1 : 1 und fünf Minuten langem Erhitzen auf 100° erhält man bei Xylose eine hellbraune, bei Arabinose eine hellgrüne und bei Rhamnose eine lachsrote Färbung. Bei Gegenwart von Galaktose und Rhamnose entstehen gelbliche, bei Glucose hellviolette und bei Fructose und Sorbose tief braunrote Farbtöne. Werden dieselben Zuckerarten mit 1%iger Lösung von Indol in Salzsäure 1 : 1 wie oben behandelt, so liefern Xylose, Fructose und Sorbose tiefbraun gefärbte Lösungen, während alle anderen hellorange werden. Aus allen Lösungen fallen nach etwa 16 Stunden schwarze Melanoide aus, und zwar besonders reichlich bei Xylose, Fructose und Sorbose. R. OFNER¹¹ untersucht die SELIWANOFF'sche Reaktion¹² auf Fructose und findet dabei, daß diese Reaktion nur unter Einhaltung ganz bestimmter Bedingungen imstande ist, eindeutige Resultate zu liefern. Aus seinen Untersuchungen geht hervor, daß diese Reaktion nicht für Ketosen spezifisch ist, sondern nur graduelle Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit der Aldosen und Ketosen anzeigt. Der Verfasser stellt die Abhängigkeit der Reaktion sowohl von der Art und Menge des vorhandenen Zuckers als auch von der Konzentration der Salzsäure, der Menge des zugesetzten Resorcins und der Dauer des Erhitzens fest. Nach Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Variablen kommt der Verfasser zu der nachstehenden Vorschrift: 5 ccm der Lösung des zu untersuchenden Zuckers, dessen Konzentration nicht größer als 3% sein darf, wird mit 5 ccm Reagens, bestehend aus einer Lösung von 0,05 g Resorcin in 100 ccm

¹⁰ Bulet. Societat da Stiinte clin. Cluj, **3**, 41 (1926); C., **1927**, I, 779.

¹¹ Chem.-Ztg., **53**, 682 (1929).

¹² Ber. dtsch. chem. Ges., **20**, 181 (1887).

24%iger Salzsäure, eine halbe Minute über freier Flamme gekocht. Bei Anwesenheit von mindestens 1 mg Fructose tritt nach dem Abkühlen eine rosarote bis rote Färbung auf. Unter den genannten Bedingungen gibt Glucose nur eine praktisch zu vernachlässigende Reaktion, 200 Teile Glucose zeigen eine 1 Teil Fructose entsprechende Färbung. Im Anschluß an diese Arbeit weist S. MALOWAN¹³ auf seine eigenen Untersuchungen bezüglich des synchronen Mechanismus und der Unspezifität der Phenolreaktion hin, aus denen hervorgeht, daß die Phenolreaktion nur bei Kohlehydratkonzentrationen innerhalb gewisser Grenzen und nur mit bestimmten Mineralsäuren durchführbar sei. Als Träger der Reaktion seien nicht die Kohlehydrate selbst, sondern die durch die Behandlung mit Mineralsäuren entstandenen Zersetzungsprodukte anzusehen, welche Aldehyd- oder Ketogruppen enthalten. H. SZANZER¹⁴ findet beim Studium der Reaktion reduzierender Kohlehydrate mit Pikrinsäure, daß die Reduktion von Pikrinsäure durch Glucose, Fructose und Lactose bereits in der Kälte, und zwar bei Fructose nach einer halben Stunde und bei beiden anderen nach einer Stunde eintritt. Da aber auch Kreatinin bereits in der Kälte Pikrinsäure reduziert, kann nach Angabe des Verfassers diese Reaktion nicht zum Nachweis obgenannter Zucker im Harn angewandt werden. Eine neue Reaktion auf Hexosen und auf Kohlehydrate, die beim Behandeln mit Schwefelsäure Hexosen abspalten, wird von E. CHIERCI¹⁵ angegeben. Zu diesem Zwecke werden 0,2 ccm der zu untersuchenden Probe über 4 ccm konzentrierter Schwefelsäure geschichtet und sodann vorsichtig gemischt. Danach werden 0,2 ccm einer 5% igen alkoholischen Lösung von Gallussäure zugesetzt. Schon in der Kälte oder, besser, beim schwachen Erwärmen zeigen die entsprechenden Zucker Grünfärbung. Die spektroskopische Untersuchung der Farblösung zeigt breite Absorptionsbanden im roten Teil des Spektrums. V. E. LEVINE und A. M. HUBBELL¹⁶ geben als geeignetes Reagens zur Unterscheidung reduzierender und nicht reduzierender Kohlehydrate eine 2%ige Lösung von Ammoniummetavanadat in 10%iger Sodalösung an. Beim Versetzen der

¹³ Chem. Ztg., 53, 800 (1929).

¹⁴ Pharmaz. Zentralhalle 70, 665 (1929).

¹⁵ L'Ateneo Parmense, 2, 2 (1930); C., 1931, II, 97.

¹⁶ Proceed. Soc. exper. Biol., 28, 199 (1931); C., 1931, I, 1647.

zu untersuchenden Lösung mit dem genannten Reagens und nachfolgender Neutralisation mit 1%iger Salzsäure zeigen reduzierende Kohlehydrate eine charakteristische Grünfärbung. Nach der Hydrolyse geben auch Polysaccharide und Glykoside dieselbe Reaktion. In gleicher Weise verhalten sich auch organische Säuren; sie zeigen aber erst bei größerer Konzentration eine deutliche Reaktion. V. E. LEVINE¹⁷ weist auf die Brauchbarkeit des Thymols als Phenolreagens für Kohlehydrate hin. Beim Versetzen einer Zuckerlösung mit einer 5%igen Lösung von Thymol in 95%igen Alkohol und konzentrierter Schwefelsäure entsteht eine tiefröte Färbung. Diese Reaktion tritt mit allen Stoffen, die Aldehydcharakter besitzen oder die beim Behandeln mit konzentrierter Schwefelsäure Aldehyde bilden, ein; ihre Empfindlichkeit entspricht ungefähr der MOLISCH-Reaktion. Nach P. K. BOSE¹⁸ lassen sich reduzierende Zucker mit Hilfe von o-Dinitrobenzol, das in alkalischer Lösung zum violett gefärbten o-chinoiden Salz reduziert wird, nachweisen. Versetzt man einen Tropfen der zu untersuchenden Lösung mit einem Tropfen einer 1%igen alkoholischen Lösung von o-Dinitrobenzol sowie fünf Tropfen einer 25%igen Sodalösung und füllt mit destilliertem Wasser auf 2 ccm auf, so tritt nach leichtem Erwärmen über kleiner Flamme bei Gegenwart von mindestens 0.006 mg Glucose pro Kubikzentimeter eine Violettffärbung ein. Glykoside sowie nicht reduzierende Disaccharide, Zuckeralkohole, Zuckersäuren, Lactone und 2-, 3-, 4-, 6-Tetramethylglucose geben diese Reaktion nicht. Zuckeracetate reagieren infolge der Verseifung positiv. Durch Umkehrung der Reaktion von Y. NAKASHIMA und K. MARUAKA¹⁹ zum Nachweis von Harnstoff gelang es I. H. FOULGER²⁰, eine neue Kohlehydratreaktion zu schaffen. Als Reagens wird eine Zinnchlorür-Harnstoff-Lösung oder eine Zinnchlorür-Guanidin-Lösung verwendet. Die erstere wird durch Auflösen von 40 g Harnstoff und 2 g Zinnchlorür in 40%iger Schwefelsäure und Auffüllen auf 100 ccm bereitet. Zur Durchführung der Reaktion werden 0,5 ccm der Zuckerlösung mit 3 ccm Reagens 45 Sekunden zum Sieden erhitzt. Dabei zeigen Ketohexosen eine Grünfärbung, die beim

¹⁷ *Proceed. Soc. exper. Biol. Med.*, **27**, 83 (1931); *C.*, **1931**, I, 322.

¹⁸ *Ztschr. f. analyt. Chemie* **87**, 110 (1932).

¹⁹ *Dtsch. Arch. f. klin. Med.*, **143**, 318 (1924).

²⁰ *Journ. of biol. Chem.*, **99**, 207 (1932); *C.*, **1933**, I, 2984.

Erkalten lebhafter wird, und Aldo- und Hexosen gelb- bis olivgrüne Färbung, die bei längerem Erhitzen in Amethystviolett übergeht. Disaccharide geben eine Mischfarbe, entsprechend den sie aufbauenden Monosen. Furfurol und Pentosen geben nur eine Gelbfärbung. Die Empfindlichkeit der Reaktion beträgt bei Fructose 0,02 bis 0,04 mg pro 3,5 ccm Lösung, für Glucose, Mannose und Galaktose 0,05 mg pro 3,5 ccm Lösung. Das Zinnchlorür-Guanidin-Reagens wird durch Auflösen von 25 g Guanidin in 40%iger Schwefelsäure zu 100 ccm Lösung und Sättigung dieser Lösung mit Zinnchlorür in der Kälte hergestellt. Es wird ebenso wie das Harnstoff-Zinnchlorür-Reagens verwendet, nur beträgt die Kochdauer eine Minute. Fructose gibt bei dieser Reaktion eine Rotfärbung, Mannose einen etwas helleren Farbton, Glucose zeigt eine blaurote und Galaktose eine zwischen Rot und Blaurot liegende Färbung. Die Empfindlichkeit der Reaktion beträgt im Durchschnitt 0,1 mg Zucker pro 3,5 ccm Lösung. C. SAMPIETRO und K. TÄUFEL²¹ berichten über eine Reaktion zur Unterscheidung von Aldo- und Kетоhexosen durch Überführung in Oxymethylfurfurol. Das durch Einwirkung von Salzsäure auf Ketosen gebildete Oxymethylfurfurol wird in einem von den Verfassern zu diesem Zwecke konstruierten Apparat im Luftstrom bei 80 bis 90° überdestilliert und in Resorcin-Salzsäure aufgefangen. Durch die entstehende Rotfärbung können bis zu 1,5 mg Fructose und bis zu 3,4 mg Saccharose nachgewiesen werden. Zur mikroskopischen Identifizierung der verschiedenen Zucker mit Hilfe der Osazon- und Hydrazonbildung schlägt M. WAGENAAR²² vor, die Reaktion in Glycerin als Lösungsmittel vorzunehmen. Der Verfasser untersucht so das Verhalten der häufiger vorkommenden Zuckerarten gegen Phenylhydrazin, Methylphenylhydrazin, Diphenylhydrazin, Nitrophenylhydrazin und p-Bromphenylhydrazin. Die verschiedenen Reaktionsprodukte werden als Mikrophotogramme festgehalten.

B. Angewandte qualitative Mikroreaktionen der Kohlehydrate.

Zum Nachweis von Saccharose in Milch empfiehlt B. ROMANI²³ die Anwendung der MOLISCH-Reaktion. Die Durchführung der Re-

²¹ Ztschr. f. analyt. Chem., **92**, 241 (1933).

²² Pharmac. Weekbl., **71**, 229 (1924).

²³ Annali. Chim. applic., **21**, 535 (1031); C., **1932**, I, 1590.

aktion wird folgendermaßen vorgenommen: Ein Tropfen Milch wird mit einem Tropfen einer 20%igen alkoholischen Lösung von α -Naphthol und mit 3 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt. Diese Mischung wird dann 3 bis 4 Sekunden lang auf kleiner Flamme zum Sieden erhitzt. Nach einer Viertelstunde beobachtet man die entstandene Färbung und schüttelt dann mit dem doppelten Volumen an Chloroform aus. Unverfälschte Milch zeigt bei dieser Behandlung rotviolette Färbung und farblose Chloroformschicht. Enthält die Milch einen Zusatz von mindestens 1,8% Saccharose, so sieht man ebenfalls eine rotviolette Färbung der Milch, aber Rotfärbung der Chloroformschicht. Werden 1,5 ccm Weinsäureserum mit zwei Tropfen 20%iger β -Naphthollösung und 4 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt und weiter wie oben behandelt, so zeigt unverfälschte Milch Grünfärbung und eine gelbliche Chloroformschicht, dagegen eine solche mit Saccharosezusatz Dunkelgrünfärbung und eine grüne Chloroformschicht. A. SABATIE²⁴ verwendet zum Nachweis von Saccharose in Milch eine Modifikation der SELIWANOFF'schen Reaktion²⁵. Für den Nachweis von Saccharose und Fructose im Milchezucker gibt M. WAGENAAR²⁶ folgende Vorschrift an: 5 mg der Probe werden in einem Tropfen einer Lösung von α -Naphthol in Glycerin suspendiert und mit ein wenig konzentrierter Schwefelsäure mit einem Platindraht vermischt. Nach etwa 10 Minuten erkennt man unter dem Mikroskop die Anwesenheit von Ketoseteilchen an der sie umgebenden blauvioletten Zone. H. TAUBER²⁷ verwendet zum Nachweis von Zucker im Harn die Kupferlösung nach S. R. BENEDICT²⁸, da diese von den verschiedenen Harnbestandteilen nicht angegriffen wird. Disaccharide reduzieren bei diesem Verfahren auch. C. GRIEBEL²⁹ berichtet über eine hochempfindliche Reaktion zum Nachweis von Pektin. Der Verfasser findet, daß die Gerbstoffidioblasten gewisser gerbstoffreicher Früchte, wie Speierling, Elsebeere, Schlehe, Kornelkirsche u. a. m.,

²⁴ Annales Fals., 24, 208 (1931); C., 1931, II, 927.

²⁵ B., 20, 181 (1887).

²⁶ Pharmac. Weekbl., 71, 281 (1934).

²⁷ Mikrochemie, XIV, 169 (1934).

²⁸ Journ. of biol. Chem., 68, 759 (1926); C., 1926, II, 2620.

²⁹ Ztschr. f. Untersuchung d. Lebensmittel, 63, 291 (1932).

eine den Gerbstoff begleitende Substanz enthalten, die imstande ist, Pektin auch noch aus sehr verdünnten Lösungen zu fällen. Aus den genannten Früchten läßt sich nun ein Preßsaft oder ein Extrakt bereiten, der ein empfindliches Pektinreagens darstellt. Wird die Reaktion in ähnlicher Weise wie die Präcipitinreaktion nach P. UHLENHUTH³⁰ zum biologischen Nachweis der verschiedenen Eiweißarten durchgeführt, so läßt sich auf diese Weise noch 17 Pektin nachweisen. J. KISSER³¹ verwendet zum histochemischen Nachweis von Stärke Jod-Phenol (Phenol, in dem etwas Jod gelöst ist) und kann damit auch kleinste Stärkeeinschlüsse (autochthone Stärke) nachweisen. Der Nachweis geschieht durch Einlegen des Objektes in Jod-Phenol und mikroskopische Betrachtung. Bei dünnen Schnitten ist die Aufhellung durch Phenol schon nach wenigen Minuten beendet und die vorhandene Stärke färbt sich rotviolett bis schwarz. Bei frischen Pflanzenschnitten muß man, um eine Emulsionsbildung zu verhindern, das Phenol durch geeignete Zusätze gegen Wasser unempfindlich machen. Dies wird nach Angabe des Verfassers durch folgende Mischungen erreicht:

1. 5 Teile Jod-Phenol und 3 Teile Jodchloralhydrat.
2. 8 Teile Jod-Phenol und 4 Teile Jod-Alkohol und 1 Teil Wasser.
3. 8 Teile Jod-Phenol und 4 Teile Jod-Glycerin und 1 Teil Wasser.

Nach A. P. SCHULZ und G. STEINHOFF³² lassen sich die verschiedenen Stärkearten durch ihr Verhalten gegen Brenzkatechinelösung unterscheiden. Beim Befeuchten der Pekarprobe mit Brenzkatechinelösung zeigt Kartoffelstärke eine blaue, Weizenstärke gelbe Färbung mit braunen Flecken. Roggenstärke erscheint rötlich, Reisstärke rötlich-weiß und Maisstärke grün. Nach Zusatz von Säuren schlägt die Färbung bei Roggen und Reisstärke nach Blau um, beim Alkalisieren kehrt die Rotfärbung wieder zurück. In einer weiteren Arbeit untersuchen die Verfasser das Verhalten der verschiedenen Stärkearten im verkleisterten und unverkleisterten Zu-

³⁰ Technik und Methodik der biologischen Blut- und Fleischuntersuchung, Jena 1909. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, 28, 449 (1908).

³¹ Mikrochemie, EMICH-Festschrift, 1930, 175.

³² Ztschr. f. Spiritusind., 55, 150 (1932); C., 1932, II, 1708.

stand gegen eine Reihe von Farbstoffen und Farbstoffgemischen³³. H. TRYLLER³⁴ untersucht ebenfalls das Verhalten von Stärke gegen Brenzkatechin und findet, daß für diese Reaktion der Eisengehalt der Stärke maßgebend sei. Eisenhaltige Stärke gibt mit Brenzkatechin bei einem pH von 6,0 bis 6,8 eine blauviolette, bei höherem pH eine rote Färbung. P. BRUÈRE³⁵ berichtet über einen histochemischen Nachweis von Cellulose im Getreidekorn. Als Reagenzien verwendet er Bromkresol und Phenolsafranin. Schließlich sei noch auf die Verwendung der Analysenquarzlampe zur Reinheitsprüfung in der Zuckerindustrie hingewiesen. Aus den Arbeiten K. ŠANDERA³⁶, H. LUNDEN³⁷, G. MEZADROLI und E. VARCHU³⁸ und E. NAEHRING³⁹ geht hervor, daß die Lumineszenzanalyse sowohl zur Typenbewertung von Handelsmustern als auch zur Betriebskontrolle sehr geeignet ist.

C. Quantitative Methoden.

I. Maßanalytische Methoden.

Zur Bestimmung von Kohlehydraten im pflanzlichen Untersuchungsmaterial wird von CH. S. HANES⁴⁰ eine Modifikation der Methode HAGEDORN-JENSEN⁴¹ angegeben, die es gestattet, durch entsprechende Zusammensetzung der Reagenzien Halbmikrobestimmungen durchzuführen. Er verwendet dazu folgende Lösungen: a) 8,25 g Kaliumferricyanid und 10,6 g entwässerte Soda werden in einem Liter destillierten Wasser gelöst. Beim Aufbewahren im Dunkeln ist die Lösung 2 bis 3 Tage lang haltbar. b) 12,5 g Ka-

³³ Ztschr. f. Spiritusind., **55**, 162 (1932); C., **1932**, II, 1708.

³⁴ Ztschr. f. Spiritusind., **55**, 201 (1932); C., **1932** II, 3026.

³⁵ Compt. rend. Acad. Sciences, **191**, 792 (1930).

³⁶ Ztschr. Zuckerind. d. Tschechoslow. Rep., **51**, 237 und 323 (1927).

³⁷ Ztschr. Zuckerind. d. Tschechoslow. Rep., **51**, 304 (1927).

³⁸ Atti III^o Congresso Nazionale Chim. pura applicata Firenze e Toscana **1929**, 580. C., **1931**, I, 2277.

³⁹ Dtsch. Zuckerind., **57**, 1007 (1932).

⁴⁰ Biochem. Journ., **23**, 99 (1929); C., **1929**, II, 2704.

⁴¹ Biochem. Ztschr., **135**, 46 (1923).

liumiodid. 25 g Zinksulfat und 125 g Kochsalz werden in 500 ccm destilliertem Wasser gelöst. c) 5 ccm Eisessig werden mit destilliertem Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. d) 1 g lösliche Stärke wird mit 20 ccm kaltem, destilliertem Wasser zu einem dünnen Brei angerührt, dieser in 60 ccm Wasser eingetragen und die Mischung 2 Minuten lang gekocht. Zur Durchführung der Bestimmung werden 5 ccm der Probe mit 5 ccm der Lösung a) eine Viertelstunde lang gekocht, dann 3 Minuten unter fließendem Wasser gekühlt, 5 ccm der Lösung b) und 3 ccm der Lösung c) hinzugefügt und das ausgeschiedene Jod mit n 75-Natriumthiosulfat titriert. Der Verfasser hat auch ein Verfahren zur Bestimmung von Glucose und Maltose in Gegenwart von Stärke angegeben und es sei bezüglich der Einzelheiten auf das Original verwiesen. E. H. CALLOW⁴² bestimmt nach der Methode HAGEDORN-JENSEN-HANES auch Saccharose in Mengen von 0.2 bis 35 mg nach Inversion mit verdünnter Salzsäure. 1 ccm n 100-Natriumthiosulfat entspricht dabei 0,329 mg Saccharose. A. CR. HULME und R. NARAIN⁴³ benützen die Methode HAGEDORN-JENSEN-HANES nach entsprechenden Abänderungen zur Durchführung von Kohlehydratstoffwechseluntersuchungen. Über die Bestimmung des Kohlehydratgehaltes von Lebensmitteln berichten B. LANDA und K. MEZEY⁴⁴. Danach werden 1 g der zu untersuchenden Substanz mit 20 ccm 3%iger Salzsäure 3 bis 4 Stunden am siedenden Wasserbad hydrolysiert und das Hydrolysat auf 100 ccm aufgefüllt. 1 ccm der Lösung wird mit 7 ccm Wasser, 1 ccm 2 3 n-Schwefelsäure und 1 ccm 10%iger Natriumwolframatlösung versetzt und vom Niederschlag abfiltriert. Im Filtrat wird die Zuckerbestimmung nach der Methode HAGEDORN-JENSEN vorgenommen. H. GOHR⁴⁵ verwendet ebenfalls zur Untersuchung von Lebensmitteln eine Modifikation der Methode HAGEDORN-JENSEN-HANES. E. M. WIDDOWSON⁴⁶ berichtet über die Bestimmung kleiner Mengen reduzierender Zucker in Kohlehydratgemischen und in Stärkehydrolysaten. Der Verfasser verwendet zu

⁴² Biochem. Journ., **24**, 57 (1930); C., **1930**, II, 275.

⁴³ Biochem. Journ., **25**, 1051 (1931); C., **1932**, I, 261.

⁴⁴ Schweiz. med. Wschr., **60**, 3 (1930).

⁴⁵ Ztschr. f. Untersuchung d. Lebensmittel, **59**, 90 (1930).

⁴⁶ Biochem. Journ., **25**, 863 (1931); C., **1931**, II, 1458.

diesen Bestimmungen die Methode HAGEDORN-JENSEN-HANES, zusammen mit der jodometrischen Aldosenbestimmungsmethode nach R. WILLSTÄTTER und W. SCHUDEL⁴⁷. Die Klärung der Zuckerlösungen wird nach Angabe des Verfassers zweckmäßig durch Bleiacetatlösung, deren Überschuß durch sekundäres Natriumphosphat entfernt wird, vorgenommen, und es soll auf diese Weise kein Zuckerverlust eintreten. Bei der Bestimmung des Zuckers im alkoholischen Auszug aus Äpfeln wird die Entfärbung des Auszuges mit Kohle empfohlen. In ähnlicher Weise geht F. S. SCHLENKER⁴⁸ bei der Mikrobestimmung von reduzierenden Zuckern und Saccharose in Pflanzensäften vor. Auch hier erfolgt die Klärung und Entfärbung des Pflanzensaftes mit Bleiacetat und Natriumphosphat und die Zuckerbestimmung nach der Methode HAGEDORN-JENSEN-HANES. Zur Bestimmung der Saccharose wird die Zuckerlösung mit Invertase behandelt. Für diesen Zweck kann aber die Zuckerbestimmung nicht nach HAGEDORN-JENSEN-HANES durchgeführt werden, weil schon die Fermentlösung selbst dabei reduzierend wirkt. Der Verfasser verwendet daher in diesem Falle die neue Methode von FOLIN mit gewissen Abänderungen (Näheres bei den kolorimetrischen Methoden). Zur Bestimmung kleiner Mengen von Invertzucker hat R. OFNER⁴⁹ ein maßanalytisches Kupferreduktionsverfahren ausgearbeitet, welches die Bestimmung einer Menge von 0.001% Invertzucker im Rohrzucker ermöglicht. Er verwendet dazu eine Lösung, die sehr wenig Kupfersulfat und viel Seignettesalz enthält (5 g kristallisiertes Kupfersulfat, 10 g wasserfreie Soda, 300 g Seignettesalz und 50 g kristallisiertes sekundäres Natriumphosphat werden in einem Liter destillierten Wasser gelöst und die Lösung nach gutem Durchschütteln mit 1 bis 2 Teelöffeln voll Kieselgur oder Kohle filtriert). Die zu untersuchende Zuckerlösung wird mit dem gleichen Volumen Reagens 4 bis 5 Minuten zum Sieden erhitzt und nach dem Erkalten der Überschuß an Kuprisalz nach Zusatz von Kaliumjodid-Rhodanid-Lösung (12 g Kaliumjodid und 4 g Kaliumrhodanid, in Wasser zu 100 ccm Lösung gelöst) und Ansäuern

⁴⁷ B., 51, 780 (1918).

⁴⁸ Journ. biol. Chem., 102, 29 (1933).

⁴⁹ Ztschr. f. Zuckerind. d. Tschechoslow. Rep., 53, 733 (1929). Chimie et Industrie, Sondernummer, 6, 1125 (1933); C., 1930, I, 1390.

mit Salzsäure 1 : 1 jodometrisch titriert. R. FISCHL⁵⁰ hat, von vorgenanntem Verfahren ausgehend, eine Mikromethode zur Bestimmung von Fructose neben Glucose und anderen Aldosen sowie Saccharose geschaffen, die sich zur Bestimmung von Fructose in Süßweinen, Fruchtsäften, Honig und dergleichen eignet. Die Methode beruht darauf, daß unter bestimmten Bedingungen nur Fructose die OFNER'sche Kupferlösung reduziert. Zu diesem Zwecke wurde die Zusammensetzung der OFNER'schen Kupferlösung etwas abgeändert. (5 g kristallisiertes Kupfersulfat, 1,5 g wasserfreie Soda, 300 g Seignettesalz, 100 g kristallisiertes sekundäres Natriumphosphat werden im 1000-cem-Meßkolben mit 900 cem destilliertem Wasser am siedenden Wasserbad zur Lösung gebracht, eine halbe Stunde weitererhitzt, dann nach Erkalten auf 1000 cem aufgefüllt, mit Kohle geschüttelt und filtriert. Die Lösung wird in einer dunklen Flasche, mit Glas- oder Kautschukstopfen wohlverschlossen, aufbewahrt.) Die Durchführung der Bestimmung erfolgt, indem 10 cem der zu untersuchenden neutral reagierenden Lösung, die, wenn nötig, zuvor mit Bleiacetat und Natriumsulfat geklärt worden war, in einem 150 cem fassenden Erlenmeyerkölbchen mit 30 cem Kupferlösung zusammengebracht werden. Das Kölbchen wird mit einem Korkstopfen verschlossen, durch dessen Bohrung ein mindestens in halbe Grade geteiltes Thermometer in die Flüssigkeit reicht und der seitlich eine Kerbe trägt, die das Entweichen von Luft aus dem Kolben gestattet. Der Kolben wird nun auf dem Wasserbade 5 Minuten lang genau auf 65° C erhitzt und dann rasch abgekühlt. Dann wird das Thermometer mit 20 cem Wasser abgespült, die Lösung mit 15 cem n/1-Salzsäure angesäuert und n/10-Jodlösung (1 cem...1 mg Fructose) zugefügt. Nach 2 Minuten wird das überschüssige Jod zurücktitriert. Zur Bestimmung von Monosacchariden in Gegenwart von Milhzucker benützt O. SVANBERG⁵¹ BARFOED's Reagens. Das abgeschiedene Kupferoxydul wird nach der Methode von G. BERTRAND (siehe Sammelreferat: Kohlehydrate, I. Teil, Mikrochemie, X, 132 [1931]) bestimmt. 2 cem der Zuckerlösung mit einem Gehalte von 1 bis 3 mg

⁵⁰ Chem. Ztg., 57, 393 (1933).

⁵¹ Ztschr. f. physiol. Chem., 188, 219 (1930).

werden genau 6,5 Minuten im siedenden Wasserbad mit 2 ccm BARFOED's Reagens (10,4 g Eisessig, 66,5 g Kupferacetat und 7 g Natriumacetat mit destilliertem Wasser zu einem Liter Lösung gelöst) unter Durchleiten von Wasserstoff erhitzt. Das ausgeschiedene Kupferoxydul wird in Ferrisulfatlösung gelöst und der Überschuß an Ferrisalz oxydimetrisch bestimmt. Der Verbrauch an Kaliumpermanganatlösung ist bis zu 2,5 mg Glucose streng proportional der Menge an reduzierendem Zucker. Bei diesem Verfahren zeigt Milchzucker nur eine geringe Eigenreduktion, und zwar entsprechen 10 mg Lactose 0,1 mg Glucose. Zur mikroanalytischen Bestimmung der Aldosen bemerken M. MACLEOD und R. ROBINSON⁵², daß sich die jodometrische Makromethode von R. WILLSTÄTTER und W. SCHUDEL⁵³ nicht ohne weiteres für mikroanalytische Zwecke anwenden lasse. Die Verfasser erhalten gute Resultate, wenn sie 1 bis 2 mg Glucose mit der drei- bis vierfachen der theoretisch notwendigen Menge an Jod und mit 0,2 bis 0,4 ccm 5% iger Sodalösung 30 Minuten bei 21° C behandeln. Unter diesen Bedingungen wird Glucose vollständig oxydiert, während Fructose und Saccharose nur zu 1 bis 2% angegriffen werden. Auch Galaktose, Maltose und Lactose werden von den Verfassern nach diesem Verfahren bestimmt. Nach M. SOMOGYI⁵⁴ läßt sich Glucose mit gutem Erfolge durch Vergärung und maßanalytischer Bestimmung der Gärungskohlensäure bestimmen. Der Verfasser berichtet, daß sich durch Titration mit 0,01 mol. Sodalösung und Phenolrot als Indikator noch 0,5 mg Glucose genau bestimmen lassen. Im Blindversuch muß die durch Selbstgärung der Hefe entwickelte Kohlensäuremenge bestimmt werden. Eine mikroanalytische Methode zur Bestimmung von Stärke in Kindermehlen wird von TH. VON FELLENBURG⁵⁵ angegeben. Danach werden 0,25 g des fein zerriebenen Kindermehles zunächst in einem geräumigen Zentrifugenglas durch Behandlung mit Äther entfettet. Die entfettete Probe wird nun mit 20 ccm Wasser und 2 ccm n/10-Jodlösung gut durchgeschüttelt und zentrifugiert. Der Rückstand wird nun mit 20 ccm

⁵² Biochem. Journ., **23**, 517 (1930).

⁵³ B., **51**, 780 (1918).

⁵⁴ Proceed. Soc. exper. Biol. Med., **27**, 630 (1930); C., **1931**, I, 698.

⁵⁵ Mitteil. Lebensmittelunters. u. Hygiene, **19**, 51 (1928).

Wasser und 1 cem n/10-Jodlösung behandelt und abermals zentrifugiert. Dieser Rückstand wird nun 3 Minuten lang mit 10 cem gesättigter Chloreiumlösung zwecks Lösung der ausgefällten Jodstärke zum Sieden erhitzt. Danach wird mit 15 cem Wasser verdünnt und zentrifugiert. Die überstehende klare Flüssigkeit wird durch ein Wattefilter in einen 100-cem-Meßkolben filtriert. Der Rückstand im Zentrifugenglas wird noch zweimal mit 5 cem Chloreiumlösung 1 Minute lang gekocht, mit 15 cem Wasser verdünnt und die Lösung zum ersten Filtrat gebracht und im Meßkolben auf 100 cem aufgefüllt. 20 cem der Lösung werden im Zentrifugenglas mit überschüssiger Jodlösung versetzt und die ausgeschiedene Jodstärke abzentrifugiert. Sodann wird der Niederschlag zweimal mit 5 bis 10 cem 60%igem Alkohol gewaschen. Der Rückstand wird in 2 cem Wasser aufgenommen, das Gemisch fast bis zur Trockne verdampft und diese Operation nochmals durchgeführt. Die zurückbleibende Stärke wird durch Behandlung mit 10 cem 0,15 n-Kaliumbichromatlösung und 20 cem konzentrierter Schwefelsäure oxydiert und der Überschuß an Bichromat jodometrisch bestimmt. Nach demselben Prinzip hat der Verfasser auch eine Methode zur Stärkebestimmung in Gemüsekonserven ausgearbeitet⁵⁶. 10 g Gemüse werden mit 5 cem Wasser aufgekocht und durch ein Filter aus Verbandgaze in ein großes Zentrifugenglas filtriert. Der Rückstand wird noch zweimal mit 20 bis 30 cem Wasser ausgekocht und die Lösungen zum ersten Filtrat gebracht. Die trübe Lösung wird nun mit einem Zehntel ihres Volumens an 50%iger Chloreiumlösung und mit überschüssiger n/10-Jodlösung versetzt und dann zentrifugiert. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen, mit 1 bis 2 cem 50%iger Chloreiumlösung versetzt und die Stärke nochmals mit n/10-Jodlösung ausgefällt. Sodann wird der Niederschlag von Jodstärke mit verdünnter Natriumbisulfitlösung tropfenweise bis zum Verschwinden der Jodfärbung versetzt, die freie Säure mittels Calciumcarbonat abgestumpft und, nach Zusatz von 1 g geschmolzenem Chloreium pro Kubikzentimeter Flüssigkeit, die Lösung 2 Minuten lang zum Sieden erhitzt. Diese Lösung wird alsdann durch eine Siebplatte, die mit einer Schicht von stärkefreier Cellulose bedeckt ist, in einen

⁵⁶ Mitteil. Lebensmittelunters. u. Hygiene, 21, 78 (1930).

Meßkolben filtriert und das Filtrat ebenso wie bei der Stärkebestimmung im Kindermehl weiterbehandelt. Eine Mikromethode zur Rohfaserbestimmung (Cellulose) wurde ebenfalls von TH. VON FELLEBERG⁵⁷ angegeben. Zum Aufschluß verwendet der Verfasser das Reagens von K. KÜRSCHNER und A. HANAK⁵⁸, bestehend aus einer Mischung von 80 Volumteilen Eisessig und 20 Volumteilen Salpetersäure ($D=1,4$). Die Bestimmung wird folgendermaßen ausgeführt. Eine Probe des zu untersuchenden Materials mit einem Rohfasergehalt von 0.5 bis 5 mg wird in einem Reagenzglas zunächst mit einigen Tropfen des genannten Reagens versetzt und dann davon weiter zugegeben, bis insgesamt 10 ccm darinnen sind; schließlich gibt man noch einige Körnchen Bimsstein dazu. Auf das Reagenzglas wird ein Birnenkühler nach FELLEBERG (ein birnförmiges Glasgefäß, welches mit kaltem Wasser gefüllt wird und mit seinem Stiel in die Epruvette eingesetzt wird) gebracht und die Mischung 20 Minuten lang in gelindem Sieden gehalten. Nachher wird vom Ungelösten durch Asbest filtriert und zuerst mit einigen Kubikzentimetern heißem Reagens, dann nacheinander mit Wasser, Alkohol, Äther gewaschen. Schließlich wäscht man nochmals mit heißem Reagens und nachher mit Wasser bis zum Verschwinden des Geruches nach Essigsäure. Der so gewaschene Rückstand wird mit Kaliumbichromat und konzentrierter Schwefelsäure oxydiert und in der üblichen Weise der Bichromatüberschuß ermittelt.

Neuere maßanalytische Mikromethoden zur Kohlehydratbestimmung im biologischen Material.

Über eine Mikrobestimmungsmethode der Fructose im Blute berichtet R. STÖHR⁵⁹. Das Verfahren beruht auf der Beobachtung, daß Fructose im Gegensatz zu Glucose beim Erhitzen mit dem

⁵⁷ Mitteil. Lebensmittelunters. u. Hygiene, **21**, 385 (1930).

⁵⁸ Ztschr. Untersuch. d. Lebensmittel, **59**, 484 (1930); C., **1930**, II, 2074.

⁵⁹ Ztschr. f. physiol. Chem., **222**, 261 (1933).

Phosphormolybdänreagens nach FOLIN-WU⁶⁰. bzw. nach O. FOLIN⁶¹ unter Blaufärbung reagiert. Das Maß der Reduktion wird dann durch Titration mit n/100-Kaliumpermanganat bis zur Entfärbung festgestellt. Die Enteiweißung des Blutes führt der Verfasser nach einer Modifikation der Methode HAGEDORN-JENSEN durch. Zur Bestimmung werden 2 ccm des Blutfiltrates mit 2 ccm Phosphormolybdänreagens versetzt und dann 25 Minuten lang im siedenden Wasserbad erhitzt. Dann wird rasch abgekühlt und gleich mit n/100-Kaliumpermanganatlösung auf farblos titriert. 1 mg Fructose entspricht bei Verwendung des FOLIN-Reagens 2,70 ccm n/100-Kaliumpermanganatlösung, bei Verwendung des FOLIN-WU-Reagens 2,05 ccm n/100-Kaliumpermanganatlösung. H. BIERRY, B. GOUCON und C. MAGNAN⁶² bestimmen nach Enteiweißung des Blutes mit Merkurinitrat nach H. BIERRY und C. MOQUET⁶³ die Glucose nach Art der Aldosenbestimmung von R. WILLSTÄTTER und W. SCHUDEL⁶⁴ jodometrisch. M. L. SMITH⁶⁵ verwendet zur Bestimmung von Glucose und Maltose in Fleischsäften, Peptonwasser, Verdauungssäften und in anderen biologischen Flüssigkeiten eine Modifikation der maßanalytischen Mikromethode nach P. A. SHAFFER und A. E. HARTMANN⁶⁶ (siehe auch Sammelreferat: Kohlehydrate, I. Teil, Mikrochemie, X, 134 [1931]). D. J. DE JONG⁶⁷ berichtet über eine neue einfache Methode zur Bestimmung von Glucose im Harn mit Hilfe des folgenden Reagens: 150 g Kaliumrhodanid werden in je 50 ccm Fehling I und Fehling II und 35 g Glycerin unter Aufkochen gelöst. Nach dem Erkalten läßt man absetzen und dekantiert vom Ungelösten. 2 ccm dieser Lösung entsprechen 4 mg Glucose. Zur Zuckerbestimmung werden 2 ccm des Reagens in der Eprouvette zum Sieden erhitzt und so lange Harn tropfenweise hinzugefügt, bis eine Gelbfärbung bestehen bleibt. Dazu sollen 0,5 bis 1 ccm Harn verbraucht werden. Bei höherem Zuckergehalt

⁶⁰ Journ. biol. Chem., **38**, 81 (1919).

⁶¹ Journ. biol. Chem., **82**, 83 (1930); C., **1931**, I, 492.

⁶² Compt. rend. Acad. Sciences, **196**, 862 (1933).

⁶³ Compt. rend. Soc. Biol., **90**, 1316 (1928).

⁶⁴ B., **51**, 780 (1918).

⁶⁵ Biochem. Journ., **26**, 1459 (1932); C., **1933**, I, 1486.

⁶⁶ Journ. biol. Chem., **45**, 365 (1920).

⁶⁷ Pharmac. Weekbl., **69**, 41 (1932)

ist der Harn zuvor entsprechend zu verdünnen. Der Analysenfehler wird mit maximal $\pm 7\%$ angegeben. N. SCHOORT⁶⁸ bestätigt die Brauchbarkeit der DE JONG'schen Methode. Er macht jedoch darauf aufmerksam, daß dabei das Fernhalten von Luft unbedingt erforderlich ist, weshalb die Flüssigkeit in ununterbrochenem Sieden zu halten ist. Ferner empfiehlt er, eine Eichung der Kupferlösung mit reiner Glucose vorzunehmen. ST. SIMONOVITS⁶⁹ überprüft die Mikromethode zur Glykogenbestimmung nach M. SAHYUN (siehe kolorimetrische Methoden) und findet nach dieser zu niedrige Werte. Verfasser gibt eine neue Methode an, bei der sich bis zu 0.6 mg Glykogen bestimmen lassen. Nach der Gewebshydrolyse mit 60%iger Kalilauge wird aus dieser Lösung das Glykogen durch mehrmaliges Füllen mit Alkohol und Kochsalz abgeschieden. Das auf diese Weise isolierte Glykogen wird nach Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure als Glucose nach J. BANG⁷⁰ bestimmt. C. A. GOOD, H. KRAMER und M. SOMOGYI⁷¹ finden nach Überprüfung einer Reihe von Glykogenbestimmungsmethoden, daß außer der PFLÜGER'schen Originalmethode nur noch das Verfahren von KAHN⁷² in Betracht komme. Auf Grund ihrer Untersuchungen kommen die Verfasser zu folgendem Mikroverfahren: Die zu untersuchende Probe wird in ein tariertes Zentrifugenglas eingewogen, welches pro Gramm Probe 2 ccm 30%ige Kalilauge enthält. Das Gläschen mit Inhalt wird dann so lange zum Sieden erhitzt, bis das Organstückchen vollständig gelöst ist. Dann werden pro Kubikzentimeter Lösung 1,1 bis 1,2 ccm Alkohol zugesetzt und es wird nochmals zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wird das ausgefallene Glykogen abzentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen und der restliche Alkohol verdampft. Der Rückstand wird 2 bis 2½ Stunden mit 0,6 bis 1 n-Salzsäure hydrolysiert. Im Hydrolysat bestimmen die Verfasser die Glucose nach der Methode von P. A. SHAFFER und A. E. HARTMANN⁷³. Ein Versuch mit der

⁶⁸ Pharmac. Weekbl., **69**, 253 (1932).

⁶⁹ Biochem. Ztschr., **265**, 437 (1933).

⁷⁰ J. BANG, Mikromethoden zur Blutuntersuchung, Verlag J. F. Bergmann München.

⁷¹ Journ. biol. Chem., **100**, 485 (1933).

⁷² PFLÜGER's Arch., **196**, 402 (1922).

⁷³ Journ. biol. Chem., **45**, 365 (1920).

Methode HAGEDORN-JENSEN gab in diesem Falle keine verwertbaren Resultate, da auch Nichtzuckerstoffe des Hydrolysates reduzierend wirkten.

II. Kolorimetrische Methoden.

Zur Bestimmung von 1 bis 20 mg Pentosen gibt K. SUMINOKURA⁷⁴ eine kolorimetrische Mikromethode an. Nach dieser Methode werden, aus dem zu untersuchenden Material, die Pentosen durch Destillation mit 12,5 n-Schwefelsäure, die mit Kaliumsulfat gesättigt ist, in Gegenwart von Zinksulfat als Katalysator im Dampf- oder Kohlensäurestrom, in Form von Furfural abgetrennt. Das gebildete Furfural wird nach der kolorimetrischen Methode von K. SUMINOKURA und J. NAKAHARA⁷⁵ mit Xylidin und Essigsäure bestimmt. Methylpentosen und Hexosen stören, wie die Verfasser angeben, bei diesem Verfahren nicht. S. ANDREWS und J. A. MILROY⁷⁶ führen die Bestimmung von Pentosen durch mehrstündiges Erhitzen der zu untersuchenden Substanz mit 50%iger Essigsäure im geschlossenen evakuierten Rohr auf 170° durch. Das gebildete Furfural wird dann kolorimetrisch mit Anilin und Essigsäure bestimmt.

Eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung von Fructose in Zuckergemischen gibt H. BREDERECK⁷⁷ an. Er findet, daß die Methode von A. PINOFF⁷⁸, welche darauf beruht, daß Ammonmolybdat in stark saurer Lösung nur von Fructose reduziert wird, nur dann einwandfreie Resultate liefert, wenn diese allein vorhanden sei, nicht aber in Gegenwart größerer Mengen anderer Zucker. Dieser Nachteil der Methode wird nach H. BREDERECK beseitigt, wenn man der Ammonmolybdatlösung für je 10 ccm 0,25 ccm 4 n-Salpetersäure zusetzt. Die Bestimmung der Fructose wird dann wie folgt durchgeführt: 1 ccm der zu untersuchenden Zuckerlösung wird mit dem oben genannten Reagens versetzt und die Mischung 2 bis

⁷⁴ Journ. of Biochemistry, **14**, 343 (1931); C., **1932**, I, 1932.

⁷⁵ Transact. of the Tottori of Agric. Science, **1**, 149 (1928); C., **1932**, I, 1932.

⁷⁶ Biochem. Journ., **27**, 1421 (1933).

⁷⁷ Ber. dtsch. chem. Ges., **64**, 1730 (1931).

⁷⁸ Ber. dtsch. chem. Ges., **38**, 3308 (1905).

5 Minuten auf 65° erwärmt. Dann wird 3 Minuten durch Einstellen in Eiswasser gekühlt und der kolorimetrische Vergleich gegen eine ebenso behandelte Fructosestandardlösung vorgenommen. Nach dieser Methode bestimmt der Verfasser Fructose in Gegenwart von 70 bis 80% Glucose, 80 bis 90% Galaktose, 60 bis 70% Mannose, 80 bis 90% Arabinose sowie von 80% Saccharose. E. M. EMMERT⁷⁹ verwendet zur Bestimmung von reduzierenden Kohlehydraten in pflanzlichem Material die BERTRAND'sche Methode mit kolorimetrischer Endbestimmung. Das ausgeschiedene Kupferoxydul wird nach Auflösung in der Ferrisalzlösung durch Zusatz von Ammoniak in das tiefblau gefärbte komplexe Kupfertetramminhydroxyd übergeführt und dieses kolorimetrisch bestimmt. Eine Bestimmung von Saccharose, Glucose und Lactose durch Überführung in Oxymethylfurfurol wird von A. CASTIGLIONE⁸⁰ angegeben. Zu diesem Zwecke werden einige Kubikzentimeter der zu untersuchenden Lösung mit zehn Tropfen 20% iger alkoholischer Resorcinlösung und dem doppelten Volumen an konzentrierter Salzsäure ($D = 1,19$) eine Minute lang gelinde gekocht. Nach dem Abkühlen wird der entstandene Niederschlag durch Zusatz von Alkohol in Lösung gebracht und die Flüssigkeit auf 20 ccm aufgefüllt. Der kolorimetrische Vergleich erfolgt gegen eine in derselben Weise behandelte Zuckerstandartlösung. CH. F. POE und F. G. EDSON⁸¹ berichten über eine neue kolorimetrische Mikromethode zur Zuckerbestimmung in verschiedenen Nahrungsmitteln. Dazu verwenden die Verfasser folgendes Reagens: 8 g m-Dinitrophenolnatrium, 200 ccm 5% ige Natronlauge, 100 g Seignettesalz werden mit destilliertem Wasser zu 1000 ccm Lösung aufgefüllt. Zur Untersuchung von Zuckerlösungen mit einem Gehalt von unter 1% enthält das Reagens noch 2,5 g Phenol pro Liter Lösung. Zur Zuckerbestimmung werden 1 ccm Probe und 3 ccm Reagens in einem FOLIN'schen Zuckerbestimmungsröhrchen sechs Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt, dann drei Minuten unter fließendem Wasser gekühlt und auf 25 ccm aufgefüllt; als Standart dient eine ebenso behandelte Glucoselösung. Fructose wird in der gleichen Weise bestimmt. Gegenwart von Saccharose ist auf

⁷⁹ Journ. Assoc. official agricult. Chemists, **15**, 327 (1932); C., **1932**, II, 1382.

⁸⁰ Annali Chim. applicata, **22**, 570 (1932); C., **1933**, I, 978.

⁸¹ Industr. engin. Chem. Analytical Edition, **4**, 300 (1932); C., **1932**, II, 3172.

die Bestimmung ohne Einfluß. Zwischen 0.5% und 3% ist die Farbstärke dem Zuckergehalt genau proportional. Zur Bestimmung des Zuckers in Butter verwenden R. H. DASTUR und K. M. SAMANT⁸² eine Modifikation der Methode FOLIN WU. Dieselbe Methode verwenden die Verfasser zur Bestimmung von Stärke nach Hydrolyse mit Takadiastase. In ähnlicher Weise bestimmt J. D. COLLINS⁸³ den Stärkegehalt von pflanzlichen Objekten. W. THOMAS und R. A. DUTSCHER⁸⁴ führen die Zuckerbestimmung im pflanzlichen Untersuchungsmaterial dermaßen durch, daß sie den alkoholischen Extrakt der Probe zur Trockne verdampfen, in Wasser aufnehmen, die Lösung durch Behandeln mit Merkurinitrat entweißen und klären und im Filtrat die Zuckerbestimmung nach der kolorimetrischen Methode von ST. R. BENEDICT und E. OSTERBERG⁸⁵ mit Pikrinsäure vornehmen (siehe auch Sammelreferat Kohlehydrate, I. Teil, Mikrochemie, X, Seite 147. 1931). In dem nach der Extraktion hinterbleibenden Rückstand wird die Bestimmung des Stärkegehaltes nach fermentativem Abbau mit Takadiastase in der gleichen Weise wie oben durchgeführt. F. S. SCHLENKER⁸⁶ bestimmt kleine Mengen von Saccharose in Pflanzensäften, indem er nach Hydrolyse mit Invertase die kolorimetrische Bestimmung nach der Ferrieyanidmethode von O. FOLIN⁸⁷ vornimmt. Dabei findet der Verfasser, daß sich das bei der Originalmethode verwendete Kaliumeyanid mit gutem Erfolg durch Natriumkarbonat ersetzen lasse. Nach J. SCHLEMMER⁸⁸ läßt sich die Gegenwart von Saccharose im Invertzucker durch Behandlung der Probe mit Kalkmilch nachweisen, da auf diese Weise der Invertzucker zerstört wird, während Saccharose unangegriffen bleibt. Zu diesem Zwecke werden 20 cem der zu untersuchenden Lösung mit 2 cem 10% iger Kalkmilch 10 bis 12 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nachher wird abzentrifugiert und die klare Lösung mit α -Naphthol auf Anwesenheit von Saccharose geprüft. Nach diesem Verfahren ist auch eine annähernde Schätzung

⁸² Indian. Journ. agricult. Sci., **3**, 460 (1933); C., **1933**, II, 2429.

⁸³ Science, **66**, 436 (1927).

⁸⁴ Journ. Amerc. chem. Soc., **46**, 1662 (1924); **46**, 1670 (1924).

⁸⁵ Journ. biol. Chem., **34**, 195 (1918); **48**, 50 (1921).

⁸⁶ Journ. biol. Chem., **102**, 29 (1933).

⁸⁷ Journ. biol. Chem., **81**, 231 (1929); C., **1929**, II, 2084.

⁸⁸ Ztschr. Zuckerind. d. Tschechoslow. Rep., **51**, 422 (1927).

des Saccharosegehaltes mit einer Genauigkeit von 1 bis 2 mg Saccharose möglich. Entsprechend dem Invertzucker verhalten sich auch Glucose, Fructose, Rhamnose, Lactose und Maltose, dagegen werden Stärke, Inulin und Glykogen schon in der Kälte quantitativ ausgefällt. J. HAMOUS⁸⁹ gibt einen Apparat zur schnellen und einfachen Bestimmung des Zuckergehaltes von Kondenswasser in Zuckerfabriken an. Die Bestimmung erfolgt kolorimetrisch mit Naphthol und Schwefelsäure. Zur Bestimmung von Monosacchariden in Gegenwart von Disacchariden verwenden H. TAUBER und J. S. KLEINER⁹⁰ eine Modifikation des BARFORD'schen Reagens in folgender Zusammensetzung: 24 g Kupferacetat, 25 cem 85 % ige Milchsäure mit destilliertem Wasser zu 500 cem Lösung aufgefüllt. Bei Verwendung des genannten Reagens finden die Verfasser die Abscheidung von Kupferoxydul direkt proportional der Menge an reduzierendem Zucker. Zur Bestimmung werden 2 cem der Zuckerlösung mit einem Gehalte von 0,1 bis 2,5 mg mit 2 cem des Reagens acht Minuten lang im siedenden Wasserbad erhitzt. Die weitere Bestimmung erfolgt kolorimetrisch nach der Methode FOLIN WU. Bei der Methode sind 2,5 mg Lactose, 2,0 mg Maltose und 5,0 mg Saccharose ohne Einfluß auf das Resultat, dagegen stört die Anwesenheit von mehr als 3 mg Kochsalz. Die Verfasser empfehlen die Methode auch zur Untersuchung von Saccharasen und Glykosiden.

H. ECKART⁹¹ berichtet über eine Methode zur Bestimmung kleinster Mengen von Stärke in Pektinerzeugnissen, deren Durchführung in folgender Weise geschieht: 10 g Pektinsaft werden mit 80 cem Chloreciumlösung (1 Teil wasserfreies Chlorecium wird in zwei Teilen Wasser gelöst; sollte die Lösung alkalisch reagieren, so ist sie mit Essigsäure gegen Phenolphthalein zu neutralisieren) versetzt und im siedenden Wasserbad 10 Minuten lang erhitzt. Nach dem Abkühlen wird auf 100 cem aufgefüllt und filtriert. 20 cem des Filtrates werden mit einigen Tropfen Jod-Jodkaliumlösung versetzt und gegen eine ebenfalls mit Jodlösung versetzte Standardlösung von Stärke in Chloreciumlösung kolorimetriert.

⁸⁹ Ztschr. Zuckerind. d. Tschechoslow. Rep., **49**, 353 (1925).

⁹⁰ Journ. biol. Chem., **99**, 249 (1932); C., **1933**, I, 2884.

⁹¹ Konserven-Ind., **12**, 409 (1925). Chem. Ztg., **12**, 243 (1925).

Eine kolorimetrische Bestimmung von Pektin, beruhend auf der Überführung in Furfurol und kolorimetrischer Bestimmung desselben, wird von P. M. SILIN und Z. A. SILINA⁹² angegeben.

Neue kolorimetrische Mikromethoden zur Kohlehydratbestimmung im biologischen Material.

Über die Brauchbarkeit der klinischen Blutzuckerbestimmungsmethode nach CRECELIUS-SEIFERT⁹³, einer Methode zur raschen Bestimmung des Blutzuckers mittels Pikrinsäure, wurde eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt. C. L. DE JONGH⁹⁴ berichtet über günstige Erfahrungen mit dieser Methode, doch darf die Pikrinsäurelösung nicht älter als sechs Wochen sein. G. JUNGMICHEL⁹⁵ gibt eine Vorschrift, nach der man bereits nach 10 Minuten mittels der Methode CRECELIUS-SEIFERT brauchbare Werte erhalten kann. Seine Vorschrift lautet: Eine Mischung von 1,9 ccm destilliertem Wasser und 0,1 ccm Blut wird durch Zusatz von 1 ccm 1,2 % iger wässeriger Pikrinsäurelösung enteiweißt und dann filtriert. Das Filtrat wird mit einem Zehntel seines Volumens an genau 20 % iger kohlenstoffsaurefreier Natronlauge versetzt und dann 5 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Während dieser Zeit muß dafür gesorgt werden, daß kein Flüssigkeitsverlust durch Verdampfen eintritt und daß auch kein Kondenswasser in das Gläschen gelangt. Nach dem Erhitzen wird die Probe unter fließendem Wasser sofort gekühlt und kolorimetriert. L. ARNOLD⁹⁶ findet, daß die Methode CRECELIUS-SEIFERT in ihrer ursprünglichen Fassung unzuverlässig sei und erheblich höhere Werte liefere als die Methode HAGEDORN-JENSEN. In einer weiteren Mitteilung berichtet ARNOLD, daß nunmehr bei Einhaltung der neuen Gebrauchsanweisung die Methode eine für klinische Zwecke vollständig genügende Genauigkeit aufweise. V. C. MYERS und C. W. ROOT⁹⁷ geben eine Verbesserung der Blutzucker-

⁹² Ztschr. Ver. dtsch. Zuckerind., 83, 390 (1933).

⁹³ Klin. Wschr., 1928, 5; Münch. med. Wschr., 75, 1301 (1928).

⁹⁴ Nederl. Tijdschr. Geneeskunde, 74, I, 3115 (1930); C., 1930, II, 1105.

⁹⁵ Süddtsch. Apothekerztg., 73, 517 (1933).

⁹⁶ Medizin. Welt, 7, 260 (1933), und 8, 364 (1934).

⁹⁷ Journ. Lab. clin. Med., 16, 890 (1931); C., 1932, I, 424.

bestimmungsmethode nach V. C. MYERS und BAILEY⁹⁸ an. Durch Enteiweißung mit Zinksulfat und Natronlauge gelingt es ihnen, bei ihrer Pikrinsäuremethode Werte zu erhalten, die mit denen der Methode von ST. R. BENEDICT⁹⁹ übereinstimmen. Für Unterscheidung von Glucose und Lactose im Blute gibt nach R. MORACCHINI und B. COSSU¹⁰⁰ die Vergärung mit Bierhefe und die Zuckerbestimmung nach FOLIN-MALMROS¹⁰¹ gute Resultate. Untersuchungen über die Wirkung der verschiedenen Enteiweißungsverfahren werden von H. GIOVANNIBATTISTA¹⁰² durchgeführt. Bei der Enteiweißung mit Wolframsäure findet der Verfasser höhere Blutzuckerwerte und höhere Werte an mit *Saccharomyces cerevisiae*, *S. ellipsoideus* und *Zygosaccharomyces MALII* unvergärbaren Substanzen als bei der Enteiweißung mit kolloidalem Zinkhydroxyd. Bei der Enteiweißung mit Merkurisalzen findet er weniger Zucker, aber mehr unvergärbare reduzierende Substanzen als bei der Enteiweißung mit Zinkhydroxyd.

M. SAHYUN¹⁰³ berichtet über ein Mikroverfahren zur Glykogenbestimmung in Organen, bei dem die Abscheidung von Glykogen aus der alkalischen Hydrolysenflüssigkeit durch Fällung mit Alkohol und Adsorption des noch gelösten Glykogen an Holzkohle erfolgt. Bei Verwendung von maximal 50 mg Kohle zu diesem Zwecke soll diese keinen störenden Einfluß auf die Bestimmung ausüben. Für die Hydrolyse des Glykogens verwendet er 5 n-Schwefelsäure und verkürzt damit die Hydrolysendauer auf 15 bis 20 Minuten. Die Bestimmung der gebildeten Glucose wird nach der Methode FOLIN WU kolorimetrisch durchgeführt.

III. Diverse andere Methoden.

F. BAERTS und G. BINARD¹⁰⁴ bestimmen Spuren von reduzierenden Zuckern mit Methylenblaulösung, indem sie die zur Reduktion

⁹⁸ Journ. biol. Chem., **65**, 393 (1925).

⁹⁹ Journ. biol. Chem., **34**, 195 (1918).

¹⁰⁰ Diagnostica Tecnica Labor., **3**, 140 (1932); C., **1933**, I, 979.

¹⁰¹ Journ. biol. Chem., **83**, 115 (1929).

¹⁰² Rev. Fac. Cienc. quim La Plata, **8**, 47 (1933).

¹⁰³ Journ. biol. Chem., **98**, 227 (1932), und **103**, 203 (1933); C., **1933**, I, 3750.

¹⁰⁴ Bull. Assoc. Chimistes Sucr. Dist. Ind. agric. France Colonies, **50**, 257 (1933); Sucrerie belge, **52**, 309 (1933); C., **1933**, II, 1444.

des Methylenblaus nötige Zeit bestimmen. Diese ist, wie die Verfasser fanden, direkt proportional der Menge an reduzierendem Zucker. Sie verwenden dieses Verfahren auch zur Bestimmung geringer Mengen von Invertzucker in Saccharose. J. A. HAWKINS¹⁰⁵ beschreibt eine gleichfalls auf einem ähnlichen Prinzip beruhende Mikrozeitmethode zur Bestimmung reduzierender Kohlehydrate. VL. STANĚK und K. ŠANDERA¹⁰⁶ geben eine refraktometrische Methode zur raschen Bestimmung des Zuckergehaltes von Saturationsschlamm an. Aus dem Schlamm werden mit Hilfe einer besonders konstruierten Zange einige Tropfen Saft gewonnen. In diesen wird refraktometrisch der Zuckergehalt bestimmt. Die Genauigkeit der Methode beträgt $\pm 0,3\%$ Zucker. Über eine potentiometrische Mikrobestimmung von reduzierenden Kohlehydraten berichten J. B. NIEDERL und R. H. MÜLLER¹⁰⁷. Zur Durchführung der Bestimmung läßt man die zu untersuchende Zuckerlösung mit einem Gehalte von ungefähr $0,1\%$ tropfenweise in das Titrationsgefäß fließen, welches FEHLING'sche Lösung enthält. Dieses ist durch einen Agarheber mit einem zweiten Gefäß leitend verbunden, in dem sich die gleiche FEHLING'sche Lösung befindet. Wenn im Reaktionsgefäß die FEHLING'sche Lösung schon fast verbraucht ist, steigt die Potentialdifferenz steil an, um dann mit Beendigung der Reaktion ihr Maximum zu erreichen. Die Verfasser verwenden für ihre Methode eine Kupferlösung von folgender Zusammensetzung: 3,95 g kristallisiertes Kupfersulfat, gelöst in 500 ccm Wasser (FEHLING I), 19,75 g Seignettesalz und 7,40 g Ätznatron, gelöst in 500 ccm Wasser (FEHLING II). 1 ccm der Lösung (I + II) entspricht 1 mg Kupfer sowie 0,635 mg Glucose, 0,679 mg Fructose, 0,638 mg Mannose, 0,777 mg Galaktose, 0,884 mg Lactose, 1,019 mg Maltose und 0,675 mg Invertzucker.

Die von J. ZWIKKER¹⁰⁸ gemachte Beobachtung, daß Reisstärke sich von anderen Stärkearten durch ihre leichtere Anfärbbarkeit unterscheidet, benützt M. WAGENAAR¹⁰⁹ zur Ausarbeitung eines brauchbaren quantitativen Auszählverfahrens zur Bestimmung von

¹⁰⁵ C., 1930, I, 717.

¹⁰⁶ Ztschr. Zuckerind. d. Tschechoslow. Rep., 57, 145 (1933); C., 1933, I, 1860.

¹⁰⁷ Journ. Amer. chem. Soc., 51, 1356 (1929).

¹⁰⁸ Rec. Trav. botan. néerlandais, 18, 1 (1921).

¹⁰⁹ Ztschr. f. Untersuch. d. Lebensmittel, 54, 357 (1927).

Reisstärke in Gemischen. Die zu untersuchende Mischung wird mit einer Lösung von 0,5 g Fuchsin S in 25 g Eisessig und 25 g Methylalkohol gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt.

H. ECKART und A. DIEM¹¹⁰ verwenden zur Bestimmung der Stärke im Pektin- oder Apfelsaft das sedimentrische Verfahren von H. WEISZ¹¹¹. Nach dieser Methode wird die Stärke durch Zusatz von Chlormalciumlösung in Lösung gebracht und mit Jodlösung als Jodstärke ausgefällt. Dies geschieht in einem besonders konstruierten Zentrifugenröhrchen, dessen unterer Teil kapillar verengt ist und eine Längenteilung trägt. Der Niederschlag von Jodstärke wird nun abzentrifugiert und seine Höhe gemessen. Zur Eichung muß ein Vergleich mit einer Lösung von Stärke in Chlormalciumlösung vorgenommen werden.

C. R. FELLERS und C. C. RICE¹¹² beschreiben ein sedimentrisches Verfahren zur Bestimmung von Pektin in nachfolgender Weise: 5 ccm Pektinsaft werden in einem entsprechenden Zentrifugengläschen mit 5 ccm Wasser und 5 ccm 10%iger Natronlauge versetzt und einige Zeit stengelassen, dabei geht das Pektin in Pektinsäure über. Diese wird durch Ansäuern mit 2 ccm 10%iger Salzsäure und 10 Minuten langem Erhitzen, bis fast zum Sieden, ausgefällt. Nun wird zur Entfernung von Luftbläschen die Masse mit einem feinen Glasstab durchgerührt. Man läßt dann abkühlen und zentrifugiert, sobald die Temperatur unter 25° C gesunken ist, 15 Minuten lang bei 2500 Touren und mißt dann die Höhe der Niederschlagsäule.

H. POSTER¹¹³ findet, daß die Methode HAGEDORN-JENSEN bei gewissen Pflanzenarten irreführende Ergebnisse liefert, da diese größere Mengen von unvergärbaren reduzierenden Substanzen enthalten. Zu diesem Zwecke empfiehlt der Verfasser die Verwendung einer Vergärungsmethode, bei der die Gärungskohlensäure manometrisch in einem WARBURG'schen Manometer bestimmt wird. Die Gewebsatmung der Hefe wird durch Verwendung eines Gasgemisches von 95% Stickstoff und 5% Kohlensäure vollständig ausgeschaltet.

¹¹⁰ Konserven-Ind., 13, 148 (1926).

¹¹¹ Ztschr. f. ges. Brauwesen, 45, 122 (1922).

¹¹² Industr. engin. Chem. Analytical Edition, 4, 268 (1932).

¹¹³ Ztschr. f. wissenschaft. Biol. Abt. E, Planta Arch. wissenschaft. Botan., 21, 699 (1934).

Der Verfasser bestimmt nach diesem Verfahren noch 0,2 mg Glucose pro Kubikzentimeter Flüssigkeit.

Zur raschen Bestimmung von reduzierenden Kohlehydraten im biologischen Material, wie Serum, Blut, Liquor, Milch usw., gibt T. UGARTE¹¹⁴ ein Verfahren an, bei dem eine alkalische Lösung von Kupferhydroxyd in Glycerin verwendet wird. Die zu untersuchende Lösung wird soweit verdünnt, daß 1 ccm der Kupferlösung durch 0.9 ccm der Probe vollständig reduziert wird. 1 ccm Kupferlösung entspricht 1 mg Glucose. Aus dem Grade der Verdünnung läßt sich dann der Zuckergehalt berechnen.

¹¹⁴ Anales Asoc. quim. Argentino, **19**, 137 (1931); Chemie, **8**, 594 (1931); C., **1932**, I, 1274.

BÜCHERSCHAU.

Stereochemie. Von K. FREUDENBERG. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse, Grundlagen und Probleme.

Im dritten und zugleich letzten Buch des vorliegenden Werkes¹ (Lieferungen 7 bis 9) wird die „Stereochemie der Elemente außer Kohlenstoff“ behandelt. Der Abschnitt „Stereochemie des Stickstoffs“, der an erster Stelle des dritten Buches steht, wurde von J. MEISENHEIMER unter Mitwirkung von W. THEILHACKER verfaßt. Die MEISENHEIMER'sche Darstellung dieses schwierigen und teilweise noch recht ungeklärten Gebietes zeichnet sich durch besondere Klarheit und Übersichtlichkeit aus; die zum Teil schwer zugängliche und weit verstreute Literatur über dieses Gebiet ist erschöpfend berücksichtigt worden. Einen sehr breiten Raum in der Darstellung der Stereochemie des Stickstoffes nimmt naturgemäß die Besprechung der Stereoisomerie der Verbindungen mit einer doppelten Stickstoff-Kohlenstoffbindung, vor allem der Oxime, ein. MEISENHEIMER legt die von ihm selbst in ausgezeichneten Experimentalarbeiten erbrachten Beweise für die Konfiguration der Ketoxime dar; diese Beweise haben gerade in letzter Zeit durch ganz andersartige physikalische Untersuchungen eine Bestätigung gefunden. Analytisch interessierte Leser seien auf die S. 1074 besprochenen Zusammenhänge zwischen Konfiguration und Salzbildungsvermögen der Oxime von 1,2-Dioxoverbindungen besonders verwiesen; diese Verbindungen enthalten bekanntlich die nickelspezifische Atomgruppe des TSCHUGAJEW'schen Reagens. Nach einer kurzen Übersicht über die Probleme und Ergebnisse aus der Stereochemie der übrigen Verbindungen mit Stickstoff-Kohlenstoffdoppelbindung, wie Hydroximsäuren, Hydrazone und Chloriminoverbindungen, beschäftigt sich MEISENHEIMER mit den stereoisomeren Diazoverbindungen; MEISENHEIMER führt uns den historischen Streit zwischen HANTZSCH und ANGELI über die Struktur der isomeren Diazoverbindungen vor Augen, der mit einer recht allgemeinen Anerkennung der von HANTZSCH gegebenen Konfigurationsformeln geendet hat. Ganz andersartig sind die anschließend besprochenen Isomerieerscheinungen, die bei Ammoniumsalzen auftreten; Ammoniumsalze mit vier verschiedenartigen Alkylgruppen sind in optische Antipoden spaltbar; die Raummodelle, die mit dieser Tatsache vereinbar sind, werden eingehend diskutiert. Besonderes Interesse beansprucht die Tatsache, daß auch Aminoxyde $R_3N=O$ mit drei verschiedenen Substituenten in optische Antipoden spaltbar sind, was nach MEISENHEIMER einen Beweis dafür darstellt, daß die fünfte Valenz in Ammoniumsalzen andersartig ist als die übrigen vier. Schließlich werden auch die allerdings durchwegs negativ ver-

¹ Besprechung der vorhergehenden Teile s. Mikrochemie XII. 276; XIII. 277; XV, 151.

laufenen Versuche zur Gewinnung stereoisomerer Amine beschrieben, deren Existenz bei pyramidalem Aufbau der Amine zu erwarten wäre. Abschließend wird die bisher allerdings wenig durchforschte Stereochemie des Phosphors und Arsens kurz besprochen; die Verbindungen dieser beiden Elemente weisen in ihrem räumlichen Bau große Ähnlichkeit mit denen des Stickstoffs auf.

Im nächsten Abschnitt behandelt K. ZIEGLER „die Stereochemie der Elemente der 4. und 6. Hauptgruppe (außer Kohlenstoff)“. Über die Stereochemie des Siliciums, Germaniums und Zinns wurden bisher nur wenige Arbeiten durchgeführt: die optisch aktiven Siliciumverbindungen sind vollkommene Analoga der Substanzen mit asymmetrischem Kohlenstoffatom; hingegen wurden vom Zinn und Germanium lediglich optisch aktive Verbindungen mit mehr salzartigem Charakter isoliert. Sehr intensiv und zugleich erfolgreich wurde die Stereochemie der organischen Schwefel-, Selen- und Tellurverbindungen bearbeitet; so wurden einerseits Sulfonium-, Selenium-, Telluroniumsalze und andererseits Sulfoxyde und Sulfinsäuren in optische Antipoden gespalten, ZIEGLER hebt in seiner inhaltlich wie formell ganz ausgezeichneten Darstellung die zahlreichen noch ungelösten Probleme dieses Teilgebietes hervor, wodurch sich die Lektüre dieses Abschnittes besonders anregend gestaltet.

Den meisten Lesern dieser Zeitschrift dürfte der letzte Abschnitt des vorliegenden Werkes über „Komplexverbindungen“ von P. PFEIFFER inhaltlich näher stehen als die vorangehenden Kapitel. Nach einer kurzen Darlegung der Grundbegriffe der Koordinationslehre werden nacheinander die einzelnen Verbindungen mit 2-, 3-, 4-, 5- und 6-zähligen Zentralatom eingehend besprochen. Während nur wenige Verbindungen mit 2- und 3-zähligen Zentralatomen bekannt sind, ist die Chemie der Verbindungen mit 4-zähligen Zentralatomen um so mannigfaltiger; die Gruppierung kann hier eine tetraedrische, plane oder pyramidale sein. Tetraedrische Lagerung nehmen Komplexverbindungen des B, Be, Zn, Cu, Ni, Pd und Pt ein, wie durch eine große Reihe einwandfrei gelungener Antipodenspaltungen exakt erwiesen werden konnte. Die Existenz zweier inaktiver isomerer Formen bei Verbindungen des Platins, Palladiums, Kobalts und Nickels von der allgemeinen Formel $Zaabb$ weist auf das Vorliegen planer oder pyramidalen Konfiguration hin; die sehr mannigfaltige Chemie derartiger Platinverbindungen wird eingehend besprochen. Die bei Verbindungen mit 6-zähligen Zentralatom auftretenden Isomeren lassen auf oktaedrische Struktur schließen; PFEIFFER beginnt mit der Besprechung der sehr zahlreichen komplexen Kobaltverbindungen und geht dann zu den 6-zähligen Verbindungen der übrigen Metalle und Metalloide über. Den Abschluß der PFEIFFER'schen Darstellung bildet die Besprechung der Nebenvalenzringe, PFEIFFER gibt an dieser Stelle zum erstenmal eine neuartige Einteilung der Innerkomplexverbindungen in Nebenvalenzverbindungen erster, zweiter und dritter Art an; diese Systematik wird dieser auch für den Analytiker wichtigen Körperklasse durchaus gerecht.

Die zehnte und letzte Lieferung enthält sehr sorgfältig zusammengestellte Autoren-, Sach- und Substanzregister, durch welche die Benützung dieses ausgezeichneten Werkes als Nachschlagewerk sehr erleichtert wird. A. BONDI.

VARIA.

Privatdozentin Frau Dr. Hedwig Langecker wurde zur a. o. Professorin für Pharmakologie an der Deutschen Universität in Prag ernannt.

Die Dechema, Deutsche Gesellschaft für chemisches Apparatewesen E. V., hat am 1. Juli 1934 ihre Geschäftsräume, die sich bisher in Seelze bei Hannover befanden, nach Berlin W 35, Potsdamer Straße 103 A, verlegt.

In Rechowoth, Palästina, wurde am 4. April ein chemisches Forschungsinstitut feierlich eröffnet. Die Begrüßungsansprache hielt Prof. Dr. R. WILLSTÄTTER, München. Leiter des Instituts ist Prof. Dr. CH. WEIZMANN. Ferner ist an diesem Institut Privatdozent Dr. E. BERGMANN — früher in Berlin — tätig.

Dr. Leopold Fuchs, Assistent am Pharmakognostischen Institut der Universität Wien, erhielt die *venia legendi* für das Fach der Pharmakognosie an der medizinischen Fakultät dieser Universität.

AUSBILDUNG FÜR MIKROCHEMISCHE ARBEITEN

An nachstehenden Hochschulen besteht unter der Leitung von Professoren, Dozenten und Assistenten die Möglichkeit eines Unterrichtes, bzw. einer Information für mikrochemische Spezialgebiete.

ÖSTERREICH:

GRAZ:

Institut für anorganische und physikalische Chemie an der Technischen Hochschule (ehemals Institut Hofrat Prof. Dr. F. EMICH).
Prof. Dr. A. DADIEU (*wird später ankündigen*).

Medizinisch-chemisches Institut der Universität.

Prof. Dr. H. LIEB im Vereine mit den Assistenten Dr. A. SOLTYS, Dr. A. VERDINO und Dr. E. SCHADENDORFF: *Mikrochemisches Praktikum unter besonderer Berücksichtigung der quantitativen organischen Mikroanalyse nach P r e g l, Tag und Zeit nach Vereinbarung.* (Inskription nur mit schriftlicher Zustimmung des Institutsvorstandes.) Lab.-Taxe 40 Schilling. 2—3mal jährlich.

Institut für pharmazeutische Chemie der Universität.

Prof. Dr. A. ZINKE: *Mikrochemische Kurse* (in den Osterferien und im Monat September auch *Ferialkurse*).

Institut für Biochemie und Mikrobiologie.Prof. Dr. F. FUHRMANN (*wird später ankündigen*).Privatdozent Dr. J. DONAU (*wird später ankündigen*).**INNSBRUCK:****Pharmakognostisches Institut der Universität.**Prof. Dr. L. KOFLER, Privatdozent Dr. R. FISCHER, Dr. A. KOFLER: *Mikroskopisch-mikrochemische Methoden.***WIEN:****Institut für medizinische Chemie der Universität.**Privatdozent Dr. A. FRIEDRICH: *Sämtliche Methoden der quantitativen organischen Mikroanalyse.***Pharmakognostisches Institut der Universität.**Prof. Dr. A. MAYRHOFER: *Mikrochemie der Gifte.*Dr. L. FUCHS und Dr. O. DAFERT: *Arzneimitteluntersuchung.***II. Chemisches Universitätsinstitut.**Privatdozent Dr. F. FEIGL: *Tüpfelanalyse.***Institut für anorganische und chemische Technologie der Technischen Hochschule.**Privatdozent Dr. techn. Ing. M. NIESSNER: *Mikrochemische Metalluntersuchungen.***Technologisches Institut der Hochschule für Welthandel.**Privatdozent D. E. GRÜNSTEIDL: *Mikromethodik der Warenprüfung einschließlich der Fluoreszenzanalyse und Fluoreszenzmikroskope.* Wien, XIX., Greinergasse 41, II/9.**DEUTSCHES REICH:****LEIPZIG:****Chemisches Laboratorium der Universität.**Prof. Dr. C. WEYGAND und Dr. HENNIG: *Organisch-mikrochemisches Praktikum.* Wöchentlich 4 Stunden. Nichtstudenten können gleichfalls solche Kurse mitnehmen, nach Anmeldung eventuell in einem mehrwöchigen ganztägigen Ferienpraktikum.**TSCHECHOSLOWAKEI:****BRNO (BRÜNN):****Analytisches Institut der naturwissenschaftlichen Fakultät der Masaryk-Universität.**Prof. Dr. J. V. DUBSKÝ und Privatdozent Dr. A. OKAČ: *Vorlesungen über die Anwendung organischer Reagenzien in der Makro- und Mikro-Analyse; Tüpfelanalyse; Mikroelektro- und Mikrogas-Analyse. Einzelne Methoden der qualitativen und quantitativen anorganischen und organischen Mikroanalyse.*

PRAG:

Chemisches Laboratorium der Universität.

Privatdozent Dr. K. HELLER: *Anorganisches mikrochemisches Praktikum.*

Privatdozent Dr. H. RAUDNITZ: *Organische Mikroanalyse.*

Medizinisch-chemisches Institut der Universität.

Prof. Dr. Z. STARY: *Biologische und medizinisch-chemische Mikromethoden.*

NEW YORK:

Universität New York, Washington Square College und Graduate School.

Unterricht in der organischen Mikroanalyse:

Einführung der organischen Mikroanalyse an der Universität New York, Washington Square College, New York City: September 1925.

Offizieller Pflichtgegenstand (Graduate Kurs No. 202) für Vorgeschrittelte am Washington Square College und Graduate School der Universität New York, New York City: Seit September 1928.

Anzahl der Studenten: etwa 20 jedes Jahr.

Leiter des organisch-mikroskopischen Unterrichtes: Prof. Dr. J. B. NIEDERL und Assistenten.

Anorganische Mikroanalyse (Undergraduate): Offizieller Kurs Nr. 44 am Washington Square College der New York University. Eine Vorlesungsstunde und 5 Stunden Laboratoriumsübungen pro Woche durch ein Semester. Teilnehmerzahl durchschnittlich 30 Studenten. Unter der Leitung von Assistant Prof. Dr. A. A. BENEDETTI-PICHLER und Assistenten.

Sommerkurs für organische und anorganische Mikroanalyse. Die Kurse finden unter der Leitung der Professoren Dr. J. B. NIEDERL und Dr. A. A. BENEDETTI-PICHLER unter Assistenz von Dr. H. ALBER statt.

Polytechnic Institute von Brooklyn (N. Y.).

Chemische Mikroskopie. Eine Vorlesungsstunde und 2 Stunden Laboratoriumsübungen pro Woche durch 2 Semester hindurch. Unter der Leitung von Prof. Dr. W. F. WHITMORE und Assistenten.

Sofern analoge Unterrichtsmöglichkeit an anderen Orten besteht, ist der Verlag nach diesbezüglicher Verständigung gern bereit, Ankündigungen an gleicher Stelle bekanntzugeben.

EMIL HAIM & CO., WIEN UND LEIPZIG

**QUALITATIVE CHEMISCHE ANALYSE
NACH DEM SCHWEFELNATRIUMGANG.**

Unter Mitarbeit von
Hofrat Dr. techn. h. c. et phil. **Georg Vortmann** †
bearbeitet und herausgegeben von
Prof. Ing. **Robert Lieber**. VIII und 184 Seiten Oktav. 1933.

RM 7.50, S 12.75

In Leinen gebunden RM 9.-, S 15.30

Das vorliegende Buch bringt den Schwefelnatriumgang, der heute außer an der Technischen Hochschule in Wien auch an andern Instituten und Schulen sowie in der Praxis eingeführt ist, in ganz neuer Durcharbeitung und enthält alle Teile, die als theoretisches Rüstzeug zur Analyse notwendig sind. Besonderen Wert erhält das Buch durch die Anleitungen, wie Fehler zu vermeiden, bzw. gemachte Fehler zu entdecken sind. Reichliche Literaturangaben bieten die Möglichkeit zur Vertiefung in fallweise besonders interessierende Fragen.

**PRAKTIKUM DER ORGANISCHEN UND
PHYSIOLOGISCHEN CHEMIE FÜR MEDIZINER.
VON DR. ERWIN SCHADENDORFF,**

Assistenten am Medizinisch-chemischen Institut der Universität Graz.
IV und 111 Seiten Kleinoktav. 1933.

RM 3.- S 5.-

Aus dem Bedürfnis nach einem Buch, das der Einteilung und dem Stoff des Chemieunterrichtes für Mediziner an den Hochschulen Österreichs und der Nachfolgestaaten entspricht, entstanden, soll dieses Praktikum als Grundlage für die organisch- und physiologisch-chemischen Übungen dienen, zugleich die Vorgänge beim Experimentieren erklären und auf die Zusammenhänge in der organischen Chemie und besonders in der Biochemie hinweisen.
